PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :
C12N 15/11, C12Q 1/68, C12N 9/00, 15/86, A61K 31/70 // C12N 15/52

A2

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: **WO 99/36517**

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00181

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. Januar 1999 (14.01.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 01 153.9 14. Januar 1998 (14.01.98) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: JENNE, Andreas [DE/DE]; Angerweg 12, D–83253 Rimsting (DE).

(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D–81675 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: IL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(54) Title: METHOD FOR SELECTING RIBOZYMES WHICH ARE CAPABLE OF COVALENTLY MODIFYING THE RIBONUCLEIC ACIDS ON 2'–OH–GROUPS IN TRANS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SELEKTION VON RIBOZYMEN, DIE RIBONUCLEINSÄUREN IN TRANS AN 2'–OH–GRUPPEN KOVALENT MODIFIZIEREN KÖNNEN

(57) Abstract

The invention relates to an in vitro selection method for selecting ribozymes which are capable of covalently modifying the ribonucleic acids on 2'–OH–groups in trans and to the ribozymes obtained using this method. The invention also relates to medicaments containing said ribozymes, said medicaments being preferably used for inhibiting gene expression – for example in gene therapy. The inventive ribozymes can also be used for producing muteins and nuclease–resistant ribonucleic acids, for example ribonuclease–resistant "antisense" oligonucleotides.

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vitro–Selektionsverfahren, mit dem Ribozyme selektiert werden können, die 2'–OH–Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren können. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Ribozyme, die durch dieses Verfahren erhältlich sind. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung diese enthaltende Arzneimittel, die vorzugsweise zur Hemmung der Genexpression – beispielsweise in der Gentherapie – verwendet werden können. Die erfingungsgemäßen Ribozyme können darüber hinaus zur Herstellung von Muteinen und nucleaseresistenten Ribonucleinsäuren – beispielsweise ribonucleaseresistenten "Antisense"–Oligonucleotide – verwendet werden.

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	**ES**	Spanien	**LS**	Lesotho	**SI**	Slowenien
AM	Armenien	**FI**	Finnland	**LT**	Litauen	**SK**	Slowakei
AT	Österreich	**FR**	Frankreich	**LU**	Luxemburg	**SN**	Senegal
AU	Australien	**GA**	Gabun	**LV**	Lettland	**SZ**	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	**GB**	Vereinigtes Königreich	**MC**	Monaco	**TD**	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	**GE**	Georgien	**MD**	Republik Moldau	**TG**	Togo
BB	Barbados	**GH**	Ghana	**MG**	Madagaskar	**TJ**	Tadschikistan
BE	Belgien	**GN**	Guinea	**MK**	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	**TM**	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	**GR**	Griechenland			**TR**	Türkei
BG	Bulgarien	**HU**	Ungarn	**ML**	Mali	**TT**	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	**IE**	Irland	**MN**	Mongolei	**UA**	Ukraine
BR	Brasilien	**IL**	Israel	**MR**	Mauretanien	**UG**	Uganda
BY	Belarus	**IS**	Island	**MW**	Malawi	**US**	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	**IT**	Italien	**MX**	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	**JP**	Japan	**NE**	Niger	**UZ**	Usbekistan
CG	Kongo	**KE**	Kenia	**NL**	Niederlande	**VN**	Vietnam
CH	Schweiz	**KG**	Kirgisistan	**NO**	Norwegen	**YU**	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	**KP**	Demokratische Volksrepublik Korea	**NZ**	Neuseeland	**ZW**	Zimbabwe
CM	Kamerun			**PL**	Polen		
CN	China	**KR**	Republik Korea	**PT**	Portugal		
CU	Kuba	**KZ**	Kasachstan	**RO**	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	**LC**	St. Lucia	**RU**	Russische Föderation		
DE	Deutschland	**LI**	Liechtenstein	**SD**	Sudan		
DK	Dänemark	**LK**	Sri Lanka	**SE**	Schweden		
EE	Estland	**LR**	Liberia	**SG**	Singapur		

Verfahren zur Selektion von Ribozymen, die Ribonucleinsäuren in trans an 2'-OH-Gruppen kovalent modifizieren können

Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vitro-Selektionsverfahren, mit dem Ribozyme selektiert werden können, die 2'-OH-Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren können. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Ribozyme, die durch dieses Verfahren erhältlich sind. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung derartige Ribozyme enthaltende Arzneimittel, die vorzugsweise zur Hemmung der Genexpression - beispielsweise in der Gentherapie - verwendet werden können. Die erfindungsgemäßen Ribozyme können darüber hinaus zur Herstellung von Muteinen und nucleaseresistenten Ribonucleinsäuren - beispielsweise ribonucleaseresistente "Antisense"-Oligonucleotide - verwendet werden.

Ribozyme sind RNA-Moleküle, die in der Lage sind, chemische Reaktionen zu katalysieren. Der prominenteste Vertreter unter den Ribozymen ist das mechanistisch und strukturell sehr

gut charakterisierte Hammerhead-Ribozym, welches die ortsspezifische Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen in RNA katalysiert. Diese Eigenschaft eröffnet die Möglichkeit, das Hammerhead-Ribozym gentherapeutisch zu nutzen, indem beispielsweise durch sequenzspezifische Spaltung einer mRNA die Expression eines bestimmten Gens inhibiert wird (Birikh et al., Eur. J. Biochem. 245 (1997), 1-6). Bisher gelang dies sowohl in Zellkultur (Jones und Sullenger, Nature Biochem. Vol 15 (1997), 902-905) als auch in Pflanzen (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997) 4861-4865) und Tierexperimenten (Lieber und Kay, J. Virol. 70 (1996), 3153-3158), wobei das Ribozym entweder von außen den Zellen zugeführt wird (exogene Applikation) oder in den Zellen durch Transkription eines Vektors synthetisiert wird (endogene Applikation). Generell besitzen somit solche und ähnliche Ribozyme ein hohes Potential als Inhibitoren der Genexpression in transgenen Tieren und Pflanzen, als Werkzeuge für Wissenschaft und Diagnose, sowie als humane Therapeutika (Burke, Nature Biotech. Vol. 15 (1997), 414-415; Marschall et al., Cell. Mol. Neurobiol. 14 (1994), 523-538). Ribozyme haben dabei mit "Antisense"-Oligonucleotiden das Prinzip gemein, auf der Ebene des Gens zu wirken, im Gegensatz zu den meisten Arzneimitteln, die auf Proteinfunktionen zielen. Allerdings wird den Ribozymen für die genannten Anwendungsbereiche auf Grund ihrer katalytischen Eigenschaften eine größere Rolle beigemessen als den "Antisense"-Oligonucleotiden (Woolf, Antisense Res. Dev. 5 (1995), 227-232).

Das Repertoire von natürlicherweise vorkommenden Ribozymen beschränkt sich auf die Spaltung und Ligation spezifischer Phosphodiesterbindungen in Ribonucleinsäuren. In jüngerer Zeit jedoch gelang es durch Techniken der "in vitro-Selektion" (Tuerk und Gold, Science 249 (1990), 505-510; Ellington und Szostak, Nature 346 (1990), 818-822) nicht nur die Funktionalität natürlicher Ribozyme zu verbessern, sondern darüber hinaus eine Reihe von Ribozymen mit neuen Eigenschaften herzustellen (Pan, Curr. Opin. Chem. Biol. Vol. 1

Nr. 1 (1997), 17-25). Durch Anwendung der in vitro-Selektion wurden beispielsweise Ribozyme mit RNA-Ligase-Aktivität (Bartel und Szostak, Science 261 (1993), 1411-1418), mit Polynucleotid-Kinase-Aktivität (Lorsch und Szostak, Nature 371 (1994), 31-36) und Peptidyl-Transferase-Aktivität (Zhang und Cech, Nature 390 (1997), 96-100) selektiert. Bisher allerdings war es nicht möglich, synthetische Ribozyme zu generieren, die RNA-Moleküle sequenzspezifisch an internen 2'-Hydroxylgruppen modifizieren. Ribozyme mit solchen Eigenschaften könnten, ähnlich den Hammerhead-Ribozymen, in therapeutischen Verfahren eingesetzt werden und darüber hinaus zu interessanten Anwendungen in der modernen Biotechnologie führen.

Aufgrund des relativ begrenzten katalytischen Spektrums der natürlicherweise vorkommenden Ribozyme ist ihre Einsetzbarkeit zur Beeinflussung der Genexpression, beispielsweise bei therapeutischen Verfahren, begrenzt. Die Wirkung von Ribozymen, die gegenwärtig zur Inhibition der Genexpression getestet werden, ist auf die Spaltung von Ziel-RNAs begrenzt. Somit liegt der vorliegenden Erfindung das technische Problem zugrunde, Ribozyme bereitzustellen, die in der Lage sind, die Genexpression auf andere Art und Weise zu beeinflußen.

Die Lösung dieses technischen Problems erfolgt durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen. Es wurde überraschenderweise gefunden, daß die durch das nachstehend näher beschriebene Selektionsverfahren erhältlichen Ribozyme fremde RNA-Moleküle sequenzspezifisch an internen 2'-OH-Gruppen kovalent modifizieren können. So modifizierte RNAs sind nicht mehr translatierbar. Daher können diese Ribozyme zu einer neuartigen Hemmung der Genexpression, beispielsweise in der Gentherapie, verwendet werden.

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Selektion eines Ribozyms, das 2'-OH-Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren kann, wobei das Verfahren durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

(a) Inkubation einer Ribonucleinsäurebibliothek mit einem Reaktanden, der mit einer 2'-OH-Gruppe in Ribonucleinsäuren reagieren kann,
(b) Selektion und Isolation von Ribonucleinsäuren, die mit dem Reaktanden eine kovalente Bindung eingegangen sind,
(c) Umschreibung in cDNA und Amplifikation der in Schritt (b) erhaltenen Ribonucleinsäuren,
(d) Iteratives Durchlaufen der Schritte (a) bis (c),
(e) Sequenzbestimmung der selektierten Ribonucleinsäuren,
(f) Bestimmung der modifizierten 2'-OH-Gruppe innerhalb der selektierten Ribonucleinsäuren,
(g) Spaltung der selektierten Ribonucleinsäure in einen Substratteil (I) und katalytischen Teil (II = Ribozym), und
(h) Überprüfung, ob der katalytisch aktive Teil (II) den Substratteil in trans kovalent modifizieren kann.

Die für dieses Selektionsvefahren benötigten Teilschritte sind dem Fachmann aus der einschlägigen, beispielsweise vorstehend beschriebenen Literatur bekannt. Das Verfahren wird nachstehend im Beispiel genau beschrieben.

Unter dem Begriff "kovalent modifizieren" wird in der vorliegenden Erfindung jede beliebige kovalente Modifikation an einer 2'-OH-Gruppe einer RNA verstanden. Vorzugsweise handelt es sich um alle Arten von Additions- und Substitutionsreaktionen, die zur Bindungsbildung unter Beteiligung der 2'-Hydroxylgruppe führen. Besonders bevorzugt ist in der vorliegenden Erfindung die kovalente Modifikation über eine Acylierung.

Unter dem Begriff "Reaktand" versteht man jedes Molekül, das entweder als Ganzes, oder als Teil auf die 2'-OH-Gruppe von RNAs übertragen werden kann. Dazu gehören prinzipiell alle Verbindungen, die mit Oxyanionen bzw. Hydroxylgruppen kova-

lent reagieren. Solche Verbindungen sind beispielsweise Carbonsäurederivate (Ester, Säurehalogenide etc), gespannte Ringsysteme (Epoxide etc.), Verbindungen mit Mehrfachbindungen (Arene etc.) und Verbindungen des Typs R-X, mit R = Alkyl oder Aryl und X = Abgangsgruppe (Halogen, Tosyl etc.). Ein bevorzugter Reaktand ist Aminosäure-AMP-Ester, wobei es sich vorzugsweise um Phenylalanyl-2'-(3')-AMP (Phe-AMP), besonders bevorzugt um Biotinyl-N-Phe-AMP (Bio-Phe-AMP) handelt.

Unter dem Begriff "iteratives Durchlaufen" ist folgendes zu verstehen: Um eine Population von katalytisch aktiven Sequenzen anzureichern, müssen die Schritte der "Selektion" und "Amplifikation" abwechselnd mehrmals hintereinander durchgeführt werden. Da es nicht möglich ist, alle unspezifischen (d.h., nicht-funktionellen) RNAs quantitativ in einem einzigen Selektionsschritt von den funktionellen Sequenzen abzutrennen, müssen mehrere Selektionszyklen durchlaufen werden. Vorzugsweise werden soviele Zyklen durchgeführt, bis keine Anreicherung der gewünschten Aktivität mehr detektiert werden kann (in der Regel nach 6 - 20 Zyklen).

Die Bestimmung der modifizierten 2'-OH-Gruppe in der Ziel-RNA kann grundsätzlich durch folgende Verfahren erfolgen: Primer-Extension (Ruskin et al., Cell 38 (1984), 317), MALDI-TOF-Sequenzierung mit Exonucleasen (Smirnov et al., Analyt. Biochem. 238 (1996), 19-25), oder wie in Beispiel 1 beschrieben durch RNAse-Sequenzierung.

Zur Spaltung der selektierten Ribonucleinsäure in Substratteil und katalytisch aktiven Teil kann man grundsätzlich wie folgt vorgehen: Bei bekannter Stelle der 2'-Modifikation wird das ursprünglich selektierte in cis-Ribozym etwa 5 - 10 Basen stromaufwärts oder stromabwärts dieser Position "geschnitten". Die beiden RNA-Fragmente (Ribozym- und Substrat-Teil) werden entweder durch in vitro-Transkription geeigneter DNA-Matrizen oder durch automatisierte Oligonucleotid-

Festphasen-Synthese erzeugt. Das in trans-Ribozym wird anschließend auf seine Fähigkeit hin getestet, das Oligonucleotid-Substrat umzusetzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Ribozyme, die durch das vorstehende und in dem Beispiel beschriebene Verfahren erhältlich sind. In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ist das Ribozym dadurch gekennzeichnet, daß es die in Figur 6a dargestellte Sekundärstruktur und Nucleinsäuresequenz von Position 28 bis 136 aufweist, oder eine davon abweichende Sequenz und/oder Sekundärstruktur, wobei diese Abweichungen nicht zum Verlust der ursprünglichen katalytischen Aktivtität führen. Diese Abweichungen betreffen die Addition, Deletion und/oder Insertion von Basen, wobei die ursprüngliche Sequenz zu mindestens 90 %, vorzugsweise mindestens 95 % und mehr bevorzugt zu mindestens 98 % erhalten bleibt. Vorzugsweise bleibt bei diesen eingeführten Änderungen die Sekundärstruktur erhalten. Diese Abweichungen betreffen vor allem auch die Sequenz von Position 28 bis 40 und/oder 68 bis 84 in Figur 6a, die entsprechend der Sequenz der gewählten Ziel-RNA (Substrat) gewählt werden muß, d.h. sie muß ausreichend Komplementarität zu der Ziel-RNA aufweisen, um diese binden und modifizieren zu können. Dabei sollten die in Figur 6a gezeigten "Loops" vorzugsweise erhalten bleiben.

Vorzugsweise sollte man bei bekannter Ziel-RNA diese beim Design der Selektion berücksichtigen, wie nachfolgend erläutert. Im Amplifikationschritt der in vitro-Selektion werden aktive Sequenzen revers transkribiert. Wie nachstehend erwähnt, führen 2'-Modifikationen in der Regel dazu, daß das reverse Transkriptase-Enzym keine DNA-Abschriften herstellen kann, aufgrund eines Stopps an der modifizierten Position. Somit werden bevorzugt Ribozyme selektiert, die innerhalb der 3'-Primerbindungsstellen 2'-modifiziert werden, da der 3'-Primer als Initiatorsequenz für die Elongation extern der reversen Transkriptionsreaktion zugeführt wird. Für die

Einführung der Modifikation innerhalb einer bestimmten Ziel-Sequenz würde man folglich selbige als Primersequenz wählen.

Der Fachmann kann anhand von allgemein bekannten Techniken Variationen in die Sequenz/Struktur des Ribozyms einfügen (beispielsweise durch Anwendung erneuter Selektionsrunden des erfindungsgemäßen Selektionsverfahrens, in vitro-Mutagenese etc.), die auch zu einem Ribozym führen können, dessen katalytische Aktivität erhöht ist oder das eine andere Substratspezifität aufweist. Soll beispielsweise das in Figur 6a dargestellte Ribozym eine RNA binden und modifizieren, die nicht die Sequenz des Substrats von Position 137 bis 164 aufweist, so muß die zur Hybridisierung benötigte Sequenz des Ribozyms beispielsweise zwischen den Positionen 28 bis 40 und/oder 68 bis 84 so geändert werden, daß es ein Substrat mit der gewünschten Sequenz binden und modifizieren kann. Um beispielsweise die Spezifität des Ribozyms dahingehend zu verändern, daß auch ein anderer, als der in der Selektion verwendete Reaktand auf die Ziel-RNA übertragen wird, kann das Selektionsverfahren erneut angewandt werden, wobei günstigerweise die partiell randomisierte Ribozymsequenz der neuen Selektion zugrunde gelegt wird. Gemäß Standardverfahren kann der Fachmann auch testen, ob ein verändertes Ribozym noch die gewünschten Eigenschaften aufweist, beispielsweise mittels der im Beispiel erläuterten Verfahren.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine DNA-Sequenz, die das erfindungsgemäße Ribozym codiert. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können auch in einen Vektor inseriert werden. Somit umfaßt die vorliegende Erfindung auch diese Ribozyme codierende DNA enthaltende Vektoren. Die Bezeichnung "Vektor" bezieht sich auf ein Plasmid (z.B. pUC18, pBR322, pBlueScript), auf ein Virusgenom oder ein anderes geeignetes Vehikel. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Nucleinsäuremolekül im Vektor mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft, die dessen

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen erlauben. Solche Vektoren enthalten neben den regulatorischen Elementen, beispielsweise einem Promotor, typischerweise einen Replikationsursprung und spezifische Gene, die die phänotypische Selektion einer transformierten Wirtszelle erlauben. Zu den regulatorischen Elementen für die Expression in Prokaryonten, beispielsweise E.coli, zählen der lac-,trp-Promotor oder T7-Promotor, und für die Expression in Eukaryonten der AOX1- oder GAL1-Promotor in Hefe, und der CMV-, SV40-,RSV-40-Promotor, MMTV-LTR-Promotor, MLV-LTR-Promotor (Adenovirus (VA1), Herpes simplex (HSV); "immediate-early" 4/5 Promotor, CMV- oder SV40-Enhancer für die Expression in tierischen Zellen. Weitere Beispiele für geeignete Promotoren sind der Metallothionein I- und der Polyhedrin-Promotor. Zu geeigneten Vektoren zählen beispielsweise auf T7 basierende Expressionsvektoren für die Expression in Bakterien (Rosenberg et al., Gene 56 (1987), 125), pMSXND für die Expression in Säugerzellen (Lee und Nathans, J. Biol. Chem. 263 (1988), 3521), und von Baculovirus abgeleitete Vektoren für die Expression in Insektenzellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist der die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthaltende Vektor ein Virus, beispielsweise ein Adenovirus, Vaccinia-Virus oder "adeno-associated-virus" (AAV), die bei einer Gentherapie von Nutzen sind. Besonders bevorzugt sind Retroviren. Beispiele für geeignete Retroviren sind MoMuLV, HaMuSV, MuMTV, RSV oder GaLV.

Allgemeine, auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren können zur Konstruktion von Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen Ribozyme und geeignete Kontrollsequenzen enthalten, verwendet werden. Zu diesen Verfahren zählen beispielsweise in vitro-Rekombinationstechniken, synthetische Verfahren, sowie in vivo-Rekombinationsverfahren, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning: A

Laboratory Manual, 2. Ausgabe, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY (1989) beschrieben sind.

Promotor-Ribozym codierende DNA kann direkt oder mit Hilfe eines Virus in die Zelle eingebracht werden. Beim direkten Verfahren wird die DNA beispielsweise über ein poly-L-Lysin an ein Fab-Fragment gebunden und von den das entsprechende Antigen tragenden Zellen absorbiert (Ferkol et al., J. Clin. Invest. 95 (1995), 493-502). Bei Verwendung eines Virus wird die in ihn verpackte DNA mittels des Virus in die Zelle eingeschleust. Wird die Promotor-Ribozym-Einheit 5'- und 3'-seitig von viralen "inverted terminal repeats" flankiert, kann diese Einheit in das Genom integrieren (Goodman et al., Blood 84 (1994), 1492-1500). Ist dies nicht der Fall, so liegt die DNA episomal vor (Flotte et al., Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 11 (1994), 517-521). Beispielsweise handelt es sich bei dem Virus um Adenoviren (Brody und Crystal, Ann. N.Y. Acad. Sci. 716 (1994), 90-101), "adeno-associated-virus" (AAV) in Kombination mit kationischen Liposomen (Philip et al., Mol. Cell. Biol. 14 (1994), 2411-2418), Adenovirus in Kombination mit Retroviren (Adams et al., J. Virol. 69 (1995), 1887-1894), Sendai-Viren (von der Leyen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (1995), 1137-1141), Retroviren (Rettinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (1994), 1460-1464) oder Vaccinia-Viren (Lee et al., Cancer Res. 54 (1994), 3325-3328).

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die vorstehend beschriebenen Ribozyme enthaltende Wirtszellen. Zu diesen Wirtszellen zählen Bakterien, Hefe, Insekten-, Pflanzen- und Tierzellen, vorzugsweise Säugerzellen. Bevorzugte Säugerzellen sind CHO-, VERO-, BHK-, HeLa-, COS-, MDCK, 293- und WI38-Zellen. Verfahren zur Transformation dieser Wirtszellen, zur phänotypischen Selektion von Transformanten und zur Expression der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle unter Verwendung der vorstehend beschriebenen Vektoren sind auf dem Fachgebiet bekannt.

INSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Die vorliegende Erfindung umfaßt außerdem ein Verfahren zur Herstellung des erfindungsgemäßen Ribozyms, wobei es sich um enzymatische oder chemische Verfahren handeln kann. Beispielsweise kann die DNA-Sequenz, die das Ribozym codiert, in einen in einem prokaryontischen Wirt replizierbaren Vektor, unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors, beispielsweise eines SP6-, T3- oder T7-Promotors, insertiert werden, was nach Gewinnung des amplifizierten Plasmids aus dem Wirt die in vitro-Transkription der das Ribozym codierenden DNA-Sequenz und die Gewinnung von Ribozym-RNA erlaubt. Alternativ kann das Ribozym durch ein chemisches Verfahren, beispielsweise ein auf der Phosphoramiditreaktion basierendes Verfahren (Sproat et al., Nucleosides & Nucleotides 14 (1995), 255-273), in großen Mengen synthetisiert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Ribozym, das so modifiziert ist, daß eine Resistenz gegenüber Nucleasen erhalten wird. Dadurch erhöht sich die Verweilzeit und damit die Wirksamkeit des Ribozyms am Zielort, beispielsweise in bestimmten Zellen eines Patienten. Außerdem können dadurch die zu applizierende Menge des Ribozyms und ggf. damit in Zusammenhang stehende Nebenwirkungen erniedrigt werden.
Beispiele für solche Modifikationen sind die Substitution der 2'-OH-Gruppen der Ribose, durch 2'-H-, 2'-O-Methyl-, 2'-O-Allyl-, 2'-Fluor- oder 2'-Amino-Gruppen (Paolella, et al., EMBO J. 11 (1992), 1913-1919, und Pieken et al., Science 253 (1991), 314-317) oder die Modifizierung von Phosphodiesterbindungen, wobei beispielsweise ein oder zwei Sauerstoffatome gegen Schwefel ausgetauscht werden (Phosphorthioat bzw. Phosphordithioat; Eckstein, Ann. Rev. Biochem. 54 (1985), 367-402, und Beaton et al., in: Eckstein, F. (Hrsg.) Oligonucleotides and analogues - A practical approach - Oxford, JRL Press (1991), 109-135) bzw. gegen eine Methylgruppe (Methylphosphonat; Miller, ebenda, 137-154). Weitere

Modifikationen umfassen die Konjugation der RNA mit poly-L-Lysin, Polyalkylderivaten, Cholesterin oder PEG. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Ribozyme mindestens eine der vorstehend beschriebenen Phosphatmodifikationen und/oder mindestens eine der vorstehend beschriebenen Ribosemodifikationen.

Die Transkription der das erfindungsgemäße Ribozym codierenden DNA-Sequenzen führt zur Synthese von Ribozymen, die die Translation der gewünschten Ziel-RNA hemmen können. Damit eignen sich sowohl die das Ribozym codierenden DNA-Sequenzen als auch die erfindungsgemäßen Ribozyme selbst als Arzneimittel, vorzugsweise zur Hemmung der Genexpression in vitro oder in vivo.

Die erfindungsgemäßen Ribozyme stellen nicht nur eine Alternative zu den erwähnten Hammerhead-Ribozymen dar, sondern zeigen bei bestimmten Applikationen Vorteile:

- Die Inhibition der Genexpression ist in transgenen (d.h. das Ribozym exprimierenden) Organismen durch Gabe des Reaktanden steuerbar. Zum Beispiel kann ein transgener Organismus ein Ribozym produzieren, das befähigt ist, mit einem externen Reaktanden eine bestimmte mRNA an einer bestimmten internen OH-Gruppe zu modifizieren. Erst durch Gabe des Reaktanden, beispielsweise in einem bestimmten Entwicklungsstadium, entfaltet das Ribozym seine katalytische Aktivität und die Expression des Zielgens wird verhindert ("induzierbarer Knock-out").

- 2'-modifizierende Ribozyme könnten als sequenzspezifische Gensonden verwendet werden, wenn auf die Ziel-RNA ein leicht nachweisbares Markermolekül übertragen wird (z.B. Fluorescein oder wie im Beispiel 1 Biotin, wobei mit Biotin markierte Moleküle über Phosphatase-konjugiertes Avidin nachgewiesen werden können).

- 2'-modifizierende Ribozyme eignen sich insbesondere zur Bekämpfung von Retroviren, da die eingeführte Modifikation das Umschreiben des viralen RNA-Genoms in DNA behindert oder gar unmöglich macht (Lorsch et al., Nucl. Acids Res. 23 (1995), 2811-2814). Auch in diesem Fall ist die Wirkung des Ribozyms durch Gabe des Reaktanden steuerbar.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit außerdem Arzneimittel, die die das erfindungsgemäße Ribozym codierende DNA oder einen, das erfindungsgemäße Ribozym codierende DNA umfassenden Vektor, ggf. in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Arzneimittel, die das erfindungsgemäße Ribozym enthalten.

Abhängig davon, ob das Ribozym selbst oder die das Ribozym codierende DNA-Sequenz, ggf. in einem rekombinanten Vektor, appliziert wird, kann die Verabreichung auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Im ersten Fall erfolgt die Verabreichung beispielsweise nach Kopplung der 3'-Enden der Ribozyme an Poly-(L-Lysin) über Standardverfahren, wie sie beispielsweise von Leonetti et al., in: Cohn and Moldave (Hrsg.), Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology 44 (1993), 143-146 (New York, Academic Press) beschrieben sind, durch Mikroinjektion nach dem Fachmann bekannten Verfahren (siehe z.B. Leonetti et al., PNAS USA 88 (1991), 2702-2706), nach Einkapselung in Liposomen, beispielsweise durch das von Farhood (Farhood et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 716 (1994) 23-34) beschriebene Verfahren, nach Verpackung in Phagen (Picket und Peabody, Nucleic Acids Res. 21 (1993), 4621-4626), oder durch Peptid-vermittelte Einschleusung in die Zellen, wie sie beispielsweise von Derossi et al., J. Biol. Chem. 269 (1994), 10444-10450, beschrieben wurde. Desweiteren kann durch Koppeln der Promotor-Ribozym-DNAs an spezifische Antikörper oder andere geeignete Liganden eine gezielte

Einschleusung des Ribozyms oder der Promotor-Ribozym codierenden DNAs in gewünschte Organe, Gewebe oder Zellen erreicht werden (Leonetti et al., PNAS USA 87 (1990), 2448-2451). Die Verabreichung erfolgt beispielsweise systemisch oder lokal, intravenös, intramuskulär, intraperitoneal, via Katheter oder durch Inhalation von Aerosolen.

Im zweiten Fall erfolgt die Verabreichung beispielsweise über eine Transfektion, beispielsweise über dem Fachmann bekannte Standardverfahren wie Calciumpräzipitation, Elektroporation, das DEAE-Dextran-Verfahren, über kationische Liposomen, beispielsweise Lipofectin, Polyamine, das Transferrin-Polylysin-Verfahren oder Verknüpfung der DNA oder des rekombinanten Vektors an einen spezifischen Antikörper oder einen anderen Liganden. Die Verabreichung kann wie vorstehend beschrieben erfolgen.

Die Formulierung des wirksamen Bestandteils kann ggf. in Kombination mit pharmazeutisch verträglichen Trägern, beispielsweise einem Verdünnungsmittel, Excipienten, Netzmittel, grenzflächenaktiven Mittel, Bindemittel etc., abhängig von der Art der Verabreichung, erfolgen.

Der wirksame Bestandteil wird in einer geeigneten Dosis verabreicht, die vom Patienten selbst, der Art und Schwere der Erkrankung etc. abhängt. Die erforderliche Dosismenge kann vom Fachmann routinemäßig bestimmt werden, wobei auch berücksichtigt wird, ob die Verabreichung als Einzeldosis erfolgt oder, über einen bestimmten Zeitraum verteilt, durch mehrfache Dosen.

Als potentielle Reaktanden dienen in der Zelle vorliegende Verbindungen, vorzugsweise Aminosäure-Adenylate, Acetylcholin, Acetyl-Coenzym A, zyklisches AMP und Nucleosid-Triphosphate und andere Zellmoleküle, die mit 2'-OH-Gruppen reagieren können. Andererseits kann auf Ribozyme selektiert werden, die einen in der Zelle nicht vorhandenen Reaktanden

3NSDOCID: <WO 9936517A2 I >

benötigen. Diese Ribozyme bieten den Vorteil, daß die Reaktion von außen - durch Zugabe des Reaktanden - gesteuert werden kann. Bevorzugt verwendet man bereits im Selektionsverfahren geeignete Reaktanden, die bekannterweise gut verträglich und leicht applizierbar sind, sowie gegebenenfalls von Zellen leicht aufgenommen werden, d.h. permeabel für Zellmembranen sind.

Die erfindungsgemäßen Ribozyme können auch Anwendung in der Gentherapie finden, wenn die Genexpression aufgrund von falschem Spleißen der RNA negativ beeinflußt wird. Durch die von den erfindungsgemäßen Ribozymen eingeführten 2'-OH-Modifikationen werden beispielsweise Reaktionen an (falschen) Positionen unterdrückt, die eine freie Hydroxylfunktion benötigen.

Eine weitere Ausführungsform betrifft die erfindungsgemäßen Ribozyme zur Herstellung von Muteinen. Da die Ribozyme auch die Übertragung einer biotinylierten Aminosäure von dem beschriebenen modifizierten Substrat (28mer-Phe-Bio) auf AMP (reverse Reaktion) katalysieren, kann diese Aktivität genutzt werden, um tRNAs an deren 3'-Ende mit nicht-cognaten Aminosäuren, oder anderen Molekülen, gemäß folgender Reaktion zu beladen:

$$\text{Aminosäure-AMP} + \text{tRNA} \xrightarrow{\text{Ribozym}} \text{aminoacylierte-tRNA}$$

Mit Hilfe so hergestellter "falsch beladener" tRNAs können somit gezielt Proteinmutanten durch in vitro-Translation gemäß Standardverfahren hergestellt werden (Mendel et al., Ann. Rev. Biophys. Biomol. Stmc. 24 (1995), 435-462).

Besonders interessant sind solche Ribozyme für neue Anwendungen in der kombinatorischen Chemie (Roberts und Stostak, PNAS USA 94 (1997), 12297-12302), da durch sie Substrate

ortsspezifisch in Proteine eingeführt werden können, welche nicht durch den genetischen Code determiniert sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft schließlich die Verwendung der erfindungsgemäßen Ribozyme zur Herstellung nucleaseresistenter Ribonucleinsäuren, da gezeigt werden konnte, daß solcherart modifizierte RNAs resistent gegen Nucleasen sind. Diese könnten somit ebenfalls Anwendung in der Gentherapie, beispielsweise als "Antisense"-Oligonucleotide, finden, wenn eine hohe Halbwertszeit der angewandten RNAs wünschenswert ist.

Die erfindungsgemäßen Ribozyme bzw. diese codierenden Vektoren können auch zur Herstellung transgener Pflanzen verwendet werden, beispielsweise um durch Hemmung der Expression bestimmter Gene gewünschte Stoffwechselprodukte anzureichern oder eine Virusresistenz zu erzeugen. Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch transgene Pflanzen.

Um die Expression der Ribozym-DNA-Sequenzen in pflanzlichen Zellen zu gewährleisten, können diese im Prinzip unter die Kontrolle eines beliebigen in pflanzlichen Zellen funktionalen Promotors gestellt werden. Die Expression der besagten DNA-Sequenzen kann generell in jedem Gewebe einer aus einer transformierten erfindungsgemäßen Pflanzenzelle regenerierten Pflanze und zu jedem Zeitpunkt stattfinden, bevorzugt jedoch findet sie in solchen Geweben statt, in denen eine veränderte Genexpression von Vorteil entweder für das Wachstum der Pflanze oder für die Bildung von Inhaltsstoffen innerhalb der Pflanze ist. Geeignet erscheinen von daher vor allem Promotoren, die eine spezifische Expression in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt der Pflanze oder aber in einem bestimmten Organ der Pflanze sicherstellen. Geeignete Promotoren sind dem Fachmann bekannt.

3NSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Die DNA-Sequenzen, die die oben beschriebenen Ribozyme codieren, sind vorzugsweise außer mit einem Promotor mit DNA-Sequenzen verknüpft, die eine weitere Steigerung der Transkription gewährleisten, beispielsweise sogenannte Enhancer-Elemente. Derartige Regionen können von viralen Genen oder geeigneten pflanzlichen Genen gewonnen oder synthetisch hergestellt werden. Sie können homolog oder heterolog zum verwendeten Promotor sein. Vorteilhafterweise werden die Ribozym-DNA-Sequenzen ferner mit 3'-DNA-Sequenzen verknüpft, die die Termination der Transkription gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt und beschrieben, beispielsweise die des Octopinsynthasegens aus Agrobacterium tumefaciens.

Die Ribozym-DNA-Sequenzen, die erfindungsgemäß in pflanzlichen Zellen eingeführt und exprimiert werden, liegen in den erfindungsgemäßem Pflanzenzellen vorzugsweise stabil ins Genom integriert vor.

Bei den erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen kann es sich grundsätzlich um Zellen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln. Von Interesse sind sowohl Zellen monocotyler als auch dicotyler Pflanzenspezies, insbesondere Zellen stärkespeichernder, ölspeichernder oder landwirtschaftlicher Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen, Hafer, Gerste, Weizen, Kartoffel, Mais, Reis, Raps, Erbse, Zuckerrübe, Sojabohne, Tabak, Baumwolle, Sonnenblume, Ölpalme, Wein, Tomate usw.

Der Transfer der DNA-Moleküle, die Ribozym-DNA-Sequenzen enthalten, erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden, vorzugsweise unter Verwendung von Plasmiden, insbesondere solchen Plasmiden, die eine stabile Integration des DNA-Moleküls in das Genom transformierter Pflanzenzellen gewährleisten, beispielsweise binären Plasmiden oder Ti-Plasmiden des Agrobacterium tumefaciens-Systems. Neben dem Agrobacterium-System kommen andere Systeme zur Einführung von DNA-Molekülen in pflanzlichen Zellen in Frage, wie z.B. das sogenannte biolistische Verfahren oder aber die Transformation

3NSDOCID: <WO 9936517A2 I >

von Protoplasten (vgl. Willmitzer L. (1993), Transgenic Plants, Biotechnology 2; 627-659 für eine Übersicht). Verfahren zur Transformation monocotyler und dicotyler Pflanzen sind in der Literatur beschrieben und sind dem Fachmann bekannt.

Die Figuren zeigen:

Fig. 1: Verschiedene nucleophile Positionen innerhalb der RNA-Bibliothek könnnen mit der Aminoacyl-Esterfunktion von 1 (Biotin-Phe-AMP) reagieren: Der Angriff der Aminofunktion (1) führt zur Peptidbindungsbildung. Durch Reaktion interner (2) oder terminaler (3) Hydroxylgruppen mit 1 entstehen RNA-Aminoacylester.

Fig. 2: Anreicherung aminoacylierter RNA im Laufe der Selektion. Am Fuß der Graphik sind das Verhältnis von RNA zu Substrat 1 sowie die Inkubationszeiten des jeweiligen Zyklus angegeben. In Zyklen 1 - 7 wurde eine 5'-aminofunktionalisierte RNA-Bibliothek (H_2N-Cys-Cit-SS-RNA) verwendet, während in allen folgenden Zyklen ohne gekoppeltes Dipeptid selektiert wurde. In den ersten sechs Selektionszyklen betrug der Anteil an aminoacylierter RNA weniger als 0,01 %. Selektionszyklus 10 wurde unter mutagenen Bedingungen durchgeführt, um die Evolution von Aminoacyltransferasen höherer Aktivität zu ermöglichen.

Fig. 3: Sequenzen der selektierten Clone ohne konstante Primerbindungsstellen. Mutationen innerhalb individueller Sequenzen sind unterstrichen.

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Fig. 4: Vorgeschlagene Sekundärstruktur des Clon 11-Ribozyms. Durch Deletionsanalyse wurde gezeigt, daß nur die eingerahmte Sequenz für die Katalyse benötigt wird.

Fig. 5: Die katalytische Aktivität des Clon 11-Ribozyms ist abhängig von der Magnesiumionen-Konzentration. Die Reaktionen wurden bei Raumtemperatur mit 5 µM radioaktiv markierter Clon 11-RNA und 25 µM 1 in Selektionspuffer durchgeführt, wobei die Mg^{2+}-Konzentration auf den angegebenen Wert (x-Achse) eingestellt wurde. Der Reaktionsmischung wurden Aliquots zu sechs verschiedenen Zeitpunkten entnommen. Zur Quantifizierung der Ribozymaktivität koppelte man die entstandene aminoacylierte RNA an Streptavidin-Agarose.

Fig. 6: (a) Vorgeschlagene Sekundärstrukturen für den Komplex aus Ribozym 28-136 und Substrat Oligonucleotid (Position 137 - 3'-Ende). Die aminoacylierte Position C147 ist gekennzeichnet.
(b) RNAse-Sequenzierung des "Wild-Typ Substrat Oligonucleotids" (links) und des aminoacylierten 28-mer Oligonucleotids (rechts). Die Unterschiede im Sequenzierungsmuster zeigen, daß die Basenposition C147 durch das Ribozym 28-136 modifiziert wurde. Das aminoacylierte Substrat wurde wie folgt erzeugt: 10 µM Ribozym 28-136 wurden mit wenigen Picomolen 5'-markiertem 28 mer-Oligonucleotid und 1 mM Biotin-Phe-AMP 1 in Selektionspuffer inkubiert. Nach 120 Minuten präzipitierte man die RNA und koppelte sie an Streptavidin-Agarose. Nicht-biotinylierte RNAs wurden durch Waschen entfernt, während biotinylierte Oligonucleotide mit 2 M 2-Mercaptoethanol oder Biotin im Überschuß von der Streptavidin-Matrix eluiert wurden. Die Sequenzierung mit RNasen erfolgte nach einem Protokoll des

Herstellers (Pharmacia). Man verwendete folgende RNasen: T1 für die Spur G, RNase U2 für A, RNase Phy M für A/U und RNase B. cereus für U/C. OH: Partieller alkalischer Verdau des Oligonucleotids. R: Unbehandelte Kontroll-RNA. Die Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem 20%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert. Das Resultat wurde unter Verwendung von 3'-[^{32}P]-markiertem 28-mer Oligonucleotid reproduziert.

Fig. 7: Repräsentative MALDI-TOF-Analyse des durch Ribozymkatalyse erzeugten Reaktionsproduktes (28-mer-Phe-Biotin). 5 µm Ribozym 28-136 wurden mit 1 µM 28-mer Oligonucleotid und 1 mM Biotin-Phe-AMP 1 in Selektionspuffer für 2 Stunden inkubiert. Die RNA wurde anschließend präzipitiert, in Wasser resuspendiert und ohne weitere Behandlung in ein Dynamo-Massenspektrometer eingespritzt. Das Molekulargewicht des modifizierten 28 mer-Substrates wurde als Durchschnittswert verschiedener Messungen in Gegenwart des unmodifizierten (nicht-reagierten) 28-mer-Oligonucleotids als internem Standard bestimmt. Der Massenunterschied zwischen nicht-reagiertem und reagiertem 28 mer-Oligonucleotid wurde mit $\Delta_{gemessen}$ = 370,5 Da kalkuliert. Der theoretische Massenunterschied zwischen 28-mer und 28-mer-Phe-Biotin beträgt $\Delta_{theoretisch}$ = 372,5 Da. Die Abweichung von 2 Da, relativ zum gemessenen Wert, liegt innerhalb der Fehlergrenzen für die Meßgenauigkeit des Massenspektrometers.

Fig. 8: Kinetische Charakterisierung der intramolekularen Reaktion, die vom Clon 11-Ribozym katalysiert wird. Die Anfangsgeschwindigkeiten v_0 der Reaktion sind gegen verschiedene Konzentrationen von Substrat 1 aufgetragen. Die Michaelis-Menten-Parameter K_m und

INSDOCID: <WO 9936517A2 I >

k_{cat} erhielt man durch "Curve fitting" der Gleichung $v_0 = (RNA]_0 \cdot [1] \cdot k_{cat}/(K_m + [1])$ unter Verwendung von KaleidaGraph (Abelbeck Software). Einsatz: Exponentialfunktion der Aminoacylierungsreaktion mit 5 µM Clon 11-RNA und 0,5 mM Biotin-Phe-AMP 1. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden mittels der Gleichung $[P]_t = [RNA] - [RNA] \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)$ bestimmt, wobei $[P]_t$ = Konzentration der aminoacylierten RNA zum Zeitpunkt t; [RNA] = Konzentration von Clon 11-RNA.

Fig. 9: Analyse der durch das Ribozym 28-136 katalysierten Rückreaktion (28-mer-Phe-Biotin + AMP):5'-[^{32}P]markiertes 28-mer-Phe-Biotin wurden über Affinitätschromatographie an Streptavidin-Agarose gereinigt, mit 2 M 2-Mercaptoethanol eluiert und in Selektionspuffer resuspendiert. (a) Repräsentativer Reaktionsverlauf der Rückreaktion sowie Negativkontrollexperimente bei 2,0 mM AMP. t_0, $t_{90'}$ und t_{5h} zeigen die Abnahme von 28-mer-Phe-Biotin-Oligonucleotid bei gleichzeitiger Zunahme des deacylierten Reaktionsproduktes (nicht modifiziertes 28-mer). In Abwesenheit von AMP bzw. Ribozym [t_{5h} (ohne AMP) und t_0 (ohne AMP) bzw. t_{5h} (ohne Rib.) und t_0 (ohne Rib.)] wurde keine Änderung der 28-mer-Phe-Biotin-Konzentration gefunden. (b) Reaktionsverlauf der Rückreaktion als Exponentialfunktion bei 2 mM AMP, 5 µM Ribozym 28-136, und 5 nM 28-mer-Phe-Biotin.

Fig. 10: Reaktionsverlauf der durch das Ribozym 28-136 katalysierten Rückreaktionen (28-mer-Phe-Biotin + ATP und 28-mer-Phe-Biotin + $tRNA^{fMet}$):·5'-[^{32}P] markiertes 28-mer-Phe-Biotin wurden über Affinitätschromatographie an Streptavidin-Agarose gereinigt, mit 2 M 2-Mercaptoethanol eluiert und in Selektionspuffer resuspendiert. 5 nM 28-mer-Phe-Biotin

wurden mit 10 mM ATP bzw. 0,2 mM $tRNA^{fMet}$ und 5 µM Ribozym 28-136 in Selektionspuffer inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden der Reaktionsmischung Aliquots entnommen und auf einem 20 %igen Polyacrylamidgel analysiert. (Repräsentativer Reaktionsverlauf der Rückreaktion bei 2,0 mM AMP). $t_{0,5h}$ bis t_{17h} zeigen die Abnahme von 28-mer-Phe-Biotin-Oligonucleotid bei gleichzeitiger Zunahme des deacylierten Reaktionsproduktes, d.h. nicht-modifiziertem 28-mer.

Fig. 11: Ribozym-katalysierte Beladung von tRNA-3'-Enden mit Substraten R. (a) Das Ribozym (fett gezeichnet) katalysiert den Transfer von R-CO, einem Teil des Reaktanden R-AMP, unter Abspaltung von Adenosin-5'-Monophosphat auf sich selbst (auf eine interne 2'-Hydroxylfunktion). (b) Das acylierte Ribozym transferiert den Ester R-CO auf das 3'-Ende einer tRNA (terminales Adenosin ist gezeigt). Diese Reaktion entspricht im Prinzip der Rückreaktion - statt AMP besetzt allerdings das terminale Adenosin einer tRNA die Bindungstasche für den Reaktanden. (c) Das freigesetzte Ribozym kann erneut mit dem Reaktanden-R-AMP reagieren ("Multiple turnover"). Für R = Biotin-Phe und Ribozym = Clon 11-Ribozym wurde gezeigt, daß die vorgeschlagene Reaktion im Prinzip möglich ist (vgl. Fig. 10). Das Clon 11-Ribozym fungiert dabei als generelle Aminoacyl-tRNA-Synthase, da die Spezifität für den Reaktanden vornehmlich durch den AMP-Teil bestimmt ist (vgl. Beispiel 1f, Inhibition durch AMP).

Das nachstehende Beispiel erläutert die Erfindung.

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Beispiel 1:

In vitro-Selektion von RNA-Molekülen mit Ester-Transferase-Aktivität

(a) Einleitung

Durch Screening von kombinatorischen Nucleinsäure-Bibliotheken können RNA- oder DNA-Moleküle mit spezifischen Bindungseigenschaften und neuartigen katalytischen Funktionalitäten isoliert werden. Die dazu angewandte Technik wird in der Literatur oftmals als "in vitro-Selektion" bezeichnet. Jüngste Ergebnisse auf diesem Gebiet haben gezeigt, daß Ribozyme und Desoxyribozyme befähigt sind, eine Vielzahl von chemischen Reaktionen zu katalysieren (Pan, Curr. Opin. Chem. Biol. Vol. 1 Nr. 1 (1997), 17-25). Nachfolgend wird die in vitro-Selektion und Charakterisierung eines neuartigen Ribozyms beschrieben, das die Übertragung des N-biotinylierten Aminoacylesters von N-biotinyliertem Phenylalanyl-2'(3')-adenosin-5'-ester (Biotin-Phe-AMP) auf eine interne 2'-Hydroxylgruppe innerhalb der Ribozymsequenz katalysiert. Die katalysierte Reaktion wird im folgenden als "Estertransfer" oder "Aminoacylierung" bezeichnet. Es wurde gezeigt, daß die Aminoacylierung kompetitiv durch den AMP-Teil des Acyldonor-Substrates (Biotin-Phe-AMP) inhibiert wird, was dafür spricht, daß vom Ribozym eine Substrat-spezifische Bindungstasche gebildet wird. Durch "Ribozym-Engineering" gelang die Herstellung einer Ribozymvariante (Ribozym 28-136), welche den Aminoacyltransfer auf ein externes Oligonucleotid katalysiert (im folgenden "in trans-Reaktion" genannt):

Ribozym 28-136

Oligonucleotid + Biotin-Phe-AMP → Oligonucleotid-Phe-Bio + AMP

Ferner wurde gezeigt, daß das Ribozym 28-136 auch die Deacylierung des Oligonucleotids (d.h. die Rückreaktion) mit hoher Effizienz beschleunigt. Ersetzte man dabei AMP durch eine tRNA, erfolgte die Deacylierung des Oligonucleotids un-

ter Aminoacylierung des tRNA-3'-Endes. Das hier beschriebene Ribozym erweitert somit das Repertoire von RNA-Katalyse auf Ribozyme, die befähigt sind, den Aminoacyl-Transfer von RNA-3'-Enden auf interne 2'-Positionen und revers zu katalysieren.

(b) Herstellung der DNA- und RNA-Bibliotheken

Die RNA-Bibliothek für den ersten Selektionszyklus wurde durch in vitro-Transkription einer synthetischen DNA-Bibliothek mit folgender Sequenz hergestellt: 5'-GGG AGC TCT GCT CTA GCC AC-N30-GAC GGT TAG GTC GCA C-N30-GTG AAG GAG TGT C-N30-GGC ACC TGC CAC GAG TC-3' (N steht für eine äquimolare Mischung der Nucleotide A, C, G, T; bei den unterstrichenen Nucleotiden handelt es sich um ein zu 30 % randomisiertes Citrullin-Aptamer-Motiv (Famulok, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994), 1698-1706). Die DNA-Bibliothek wurde durch automatisierte Oligonucleotid-Festphasensynthese hergestellt. Die Sequenzen der verwendeten Primer waren TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG CTC TGGC TCT AGC CAC sowie GAT CCC TCG TGG CAG GTG CC (Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase ist unterstrichen). Die PCR-Amplifikation der DNA-Bibliothek und die in vitro-Transkription mittels T7-RNA-Polymerase erfolgten nach molekularbiologischen Standardprotokollen (Abelson Hrsg., Meth. in Enzymology 267 (1996), 275-436). Eine genaue Beschreibung findet sich in: A. Jenne, Diplomarbeit aus dem Fachbereich Biochemie an der LMU München, 1995. Um die in den ersten 7 Selektionszyklen verwendete 5'-Amino-modifizierte RNA-Bibliothek (H_2N-Cit-Cys-SS-RNA) herzustellen, wurde die in vitro-Transkription in Gegenwart eines 8-fachen Überschusses an Guanosin-5'-phosphorthioat (Burgin und Pace, EMBO J. 9 (1990), 4111-4118) gegenüber den restlichen Nucleotidtriphosphaten durchgeführt. Die resultierende 5'-thiolmodifizierte RNA-Bibliothek wurde dann mit einem 50-molaren Überschuß an thiopyridyl-aktiviertem NH_2-Cit-Cys(thipy)-COOH in Kopplungspuffer (5 mM EDTA, 25 mM Na-PO_4, pH 7,7) für 20 Minuten zur Reaktion gebracht. Die Vollstän-

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

digkeit der Reaktion wurde spektrometrisch durch Messung des freigesetzten Thiopyridons bei 343 nm bestimmt. Die RNA-Bibliothek wurde dann mit Ethanol präzipitiert und anschließend zweimal mit je 150 µl 70 % Ethanol gewaschen. In den Selektionszyklen 7 - 13 wurde mit einer 5'-unmodifizierten RNA-Bibliothek (ohne eingeführte Thio- / Aminofunktion) selektiert, da das gekoppelte Dipeptid nachweislich keinen Einfluß auf die angereicherte Aminoacyltransferase-Aktivität hatte.

(c) Synthese der Verbindungen Biotin-Phe-AMP und NH_2-Cit-Cys(thipy)-COOH

Die Synthese der in der Selektion verwendeten Verbindungen NH_2-Cit-Cys(thipy)-COOH und N-biotinyliertem Phenylalanyl-2'(3')-adenosin-5'-ester (Biotin-Phe-AMP) sind beschrieben in: A. Jenne, Diplomarbeit an der LMU München aus dem Fachbereich Biochemie, 1995. Beide Verbindungen wurden NMR- und massenspektroskopisch charakterisiert.

(d) Durchführung der in vitro-Selektion

Die in vitro-Selektion wurde mit einer RNA-Bibliothek von etwa 5×10^{14} verschiedenen Sequenzen durchgeführt. Die RNA wurde bei 94°C für 2 Minuten in Magnesium-freiem Selektionspuffer (200 mM NaCl, 50 mM K-MOPS, pH 7,4) denaturiert. Anschließend wurde die Konzentration an Mg^{2+}-Ionen im Puffer auf 5 mM eingestellt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Transesterifizierungsreaktion wurde durch Zugabe von N-biotinyliertem Phenylalanyl-2'(3')-adenosin-5'-ester (Biotin-Phe-AMP) initiiert. Der Reaktionsansatz wurde dann bei Raumtemperatur inkubiert und nach den in Figur 2 angegebenen Zeiten durch eine Sephadex G-50-Säule (Pharmacia, ca. 10 ml) filtriert, um überschüssiges Biotin-Phe-AMP abzutrennen. Diejenigen Fraktionen, die RNA enthielten, wurden mit Ethanol präzipitiert, in 500 µl Streptavidin-Kopplungspuffer (150 mM NaCl, 25 mM Na-PO_4, pH 6,9) resuspendiert und mit

250 µl gequollener Streptavidin-Agarose (Pierce) für 30 Minuten inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend in eine Polyethylen-Säule (Biorad) transferiert und mit je 20 Säulenvolumina Waschpuffer W1 (1 M NaCl, 5 mM EDTA, 25 mM K-MOPS, pH 7,4), Waschpuffer W2 (4 M Harnstoff, 5 mM EDTA, mit K-MOPS auf pH 7,4 eingestellt), Waschpuffer W3 (3 M Guanidiniumchlorid, 5 mM EDTA) und schließlich mit Wasser gewaschen, um nicht-biotinylierte RNA-Moleküle abzutrennen. RNA-Moleküle, die über den Biotinteil an Streptavidin-Agarose gekoppelt waren, wurden unter Spaltung der Biotin-Streptavidin-Wechselwirkungen mit 0,2 M 2-Mercaptoethanol (Selektionszyklen 1-6) bzw. 2 M 2-Mercaptoethanol (Selektionszyklen 7-13) eluiert. Die eluierten RNA-Moleküle wurden mit Ethanol präzipitiert, revers transkribiert, PCR-amplifiziert und für den nächsten Selektionszyklus durch in vitro-Transkription wieder in RNA umgeschrieben (Famulok, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994), 1698-1706). In den ersten sechs Selektionszyklen wurden 1 mM Biotin-Phe-AMP mit 20 µM [α-^{32}P]-UTP markierter aminofunktionalisierter RNA für 20 Stunden inkubiert. In späteren Selektionszyklen wurde der Selektionsdruck durch verkürzte Inkubationszeiten und verringerte Konzentrationen an RNA bzw. Biotin-Phe-AMP erhöht (vergl. Fig. 2). Der Prozentsatz an Transesterasen (Ribozyme, die den Aminoacyltransfer katalysieren) wurde über den Anteil an radioaktiv markierter RNA bestimmt, der an Streptavidin-Agarose gebunden hatte. In Selektionszyklus 10 wurde die PCR-Amplifikation unter mutagenen Bedingungen durchgeführt, um die Evolution noch aktiverer Ribozyme zu ermöglichen (Cadwell und Joyce, PCR Meth. Appl. 2 (1992) 28-33). Die an Transesterasen angereicherte RNA-Bibliothek wurde nach Selektionszyklus 13 cloniert und sequenziert (Famulok, J. Am. Chem. Soc. 116 (1994), 1698-1706). Allgemeine Anleitungen zu den beschriebenen Selektionsschritten finden sich in Abelson Hrsg., Meth. in Enzymology 267 (1996), 275-436.

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

(e) Selektierte Ribozym-Sequenzen

Man erhielt Sequenzen von 27 Clonen, die in drei Sequenzfamilien (I, II, II) unterteilbar sind (siehe Fig. 3). Mitglieder einer Familie unterscheiden sich nur durch Punktmutationen, wahrscheinlich auf Grund der zusätzlich eingeführten Diversität in Selektionszyklus 10. Clon 11 aus der Sequenzfamilie III wurde einer genaueren Analyse unterzogen.

(f) Deletionsanalyse des Clons 11-Ribozyms, Magnesiumabhängigkeit und Inhibition der Reaktion

Durch Deletionsanalyse gelang es, das Voll-Länge-Clon-11-Ribozym auf ein katalytisch aktives Minimalmotiv einzuschränken (siehe Fig. 4). Um die minimalen Sequenzanforderungen des Ribozymes zu bestimmen, wurden verschiedene verkürzte Versionen des Clon-11-Ribozyms hergestellt. Alle getesteten RNA-Konstrukte erhielt man durch in vitro-Transkription von entsprechenden DNA-Fragmenten, die wiederum durch "nested-PCR" unter Verwendung geeigneter Primer erzeugt wurden. In Figur 5 ist die Abhängigkeit der Ribozym-katalysierten Aminoacylierung von der Konzentration an Magnesiumionen dargestellt. Durch weitere Analyse konnte gezeigt werden, daß das Clon-11-Ribozym kompetitiv durch AMP gehemmt wird (Ki = 4,7 mM), wohingegen Biotin nur ein sehr schwacher Inhibitor der Reaktion ist.

(g) Bestimmung der Reaktionsstelle im Clon-11-Ribozym und Herstellung einer in-trans-Ribozymvariante

Zur Bestimmung der Reaktionsstelle (= aminoacylierte 2'-Hydroxylfunktion innerhalb der RNA-Sequenz) wurde wie folgt verfahren:

1. Partieller RNase T1-Verdau des aminoacylierten Clon-11-Ribozyms zur Ermittelung des Sequenzbereiches, in dem die Reaktion erfolgt.

2. Spaltung des Clon-11-Ribozyms in einen Substrat-Teil (28-mer-Oligonucleotid; Basenposition 137-164) und in einen katalytischen Teil (Ribozym 28-136; Basenposition 28-136) auf Grundlage der unter Punkt 1. erhaltenen Daten.
3. RNase-Sequenzierung des aminoacylierten 28-mer-Oligonucleotids zur exakten Bestimmung der Reaktionsstelle.
4. Massenspektroskopische Untersuchung und Modifikationsanalyse der Ribozym-katalysierten Reaktion zur Bestätigung der Reaktionsstelle.

Zu 1.) Um herauszufinden, welche 2'-Hydroxylfunktion im Clon-11-Ribozym aminoacyliert wurde, inkubierte man 5'- bzw. 3'-[^{32}P]-markiertes Ribozym mit Biotin-Phe-AMP und immobilisierte die biotinylierten RNAs an Streptavidin-Agarose. Nachdem man die nicht-aminoacylierten RNAs durch Waschen der Affinitätsmatrix entfernt hatte, wurden die gekoppelten aminoacylierten RNAs partiell an Guanosinresten mit RNase T1 verdaut. Die aus dieser Behandlung resultierenden nicht-aminoacylierten RNA-Fragmente wurden durch Spülen der Affinitätsmatrix gesammelt, wohingegen die auf der Agarose verbleibenden aminoacylierten Fragmente mit 2 M 2-Mercaptoethanol in der Hitze eluiert und seperat aufgefangen wurden. Beide Fraktionen (die aminoacylierten bzw. die nicht-aminoacylierten Fragmente) wurden anschließend auf einem denaturierenden 20% Polyacrylamidgel analysiert. Die Analyse ergab, daß sich die Reaktionsstelle innerhalb der 3'-Primerregion (zwischen dem 3'-Ende und der Position 137) befindet, weil aminoacylierte Fragmente im Gegensatz zu nicht-aminoacylierten Fragmenten im Gel stärker retardiert werden, d. h. langsamer wandern.

Zu 2.) Zur exakten Bestimmung der Reaktionsstelle spaltete man das ursprünglich selektierte Clon-11-Ribozym in einen Substrat-Teil (28-mer-Oligonucleotid; Basenposition 137-164) und in einen katalytischen Teil (Ribozym 28-136; Basenposition 28-136). Die vorgeschlagene Sekundärstruktur des Komplexes aus Ribozym 28-136 und dem Oligonucleotid-Substrat

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

ist in Figur 6a gezeigt. Bei Inkubation des Ribozyms 28-136 und Biotin-Phe-AMP konnte ein signifikanter Anteil des verwendeten 28-mer-Oligonucleotids an Streptavidin-Agarose immobilisiert werden, was eindeutig zeigte, daß das Ribozym 28-136 die Aminoacylierung des Oligonukleotids katalysiert.

Zu 3.) Um zu bestimmen welche 2'-Hydroxylfunktion innerhalb des 28-mer-Oligonucleotids reagiert hatte, wurde das aminoacylierte 28-mer-Oligonucleotid mit basenspezifischen RNasen sequenziert. Das Ergebnis ist in Figur 6b gezeigt. Das Sequenzierungsmuster für das aminoacylierte und nicht-aminoacylierte Oligonucleotid ist vom 3'-Ende bis zur Position C147 identisch. An Position C147 zeigt das nicht-aminoacylierte 28-mer-Oligonucleotid die erwartete Bande in der U/C Spur (Kreis in Fig. 6b), während keine Bande bei dem aminoacylierten 28-mer-Oligonucleotid zu finden ist (Kästchen in Fig. 6b). Die beobachtete Nucleaseresistenz an Position C147 für das aminoacylierte 28-mer-Oligonucleotid ist offensichtlich eine Folge der 2'-Veresterung. Die Sequenzierungsbanden, die den Positionen 148-164 zugeordnet werden können, weisen für das aminoacylierte Oligonucleotid eine reduzierte Gelmobilität auf (relativ zum nicht-aminoacylierten Oligonucleotid).

Zu 4.) Das MALDI-TOF-Massenspektrum der in-trans-Aminoacylierung und die in Tabelle II zusammengefaßte Analyse mit modifizierten 28-mer-Oligonucleotiden beweisen zweifelsfrei, daß die 2'-OH-Gruppe an Position C147 die atomare Position der Aminoacylierung ist.

(h) <u>Kinetische Analyse der Ribozym-katalysierten Aminoacylierung</u>

Sowohl der Voll-Länge-Clon-11, als auch die unter (f) und (g) beschriebenen Ribozymvarianten wurden kinetisch charakterisiert. Die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der intramolekularen Aminoacylierungen sind in Tabelle I zusammengefaßt. Die Michaelis-Menten-Parameter für die vom Voll-

Länge-Clon-11 katalysierte Reaktion wurden bestimmt mit kcat = 0,04 min^{-1} und Km = 119 μM (siehe Fig. 8). Bei der in-trans-Reaktion (Aminoacylierung eines 28-mer Oligonucleotids mit Biotin-Phe-AMP durch das Ribozym 28-136) wurden sowohl die Hin- als auch die Rückreaktion untersucht. Die Quantifizierung der reversen Reaktion ist in Fig. 9 dargestellt. Die Analyse ergab, daß das Gleichgewicht der Reaktion mit einem logK von etwa -6 stark auf Seiten der Edukte (28-mer und Biotin-Phe-AMP) liegt.

Tabelle I

Geschwindigkeitskonstanten der intramolekularen Aminoacylierung von verkürzten Clon 11-Konstrukten

Clon 11 Konstrukt (Nucleotid-Grenzen)	k_{obs} $[h^{-1}]$#
1-164	1,8 ± 0,4
16-164	2,7 ± 0,2
28-164	5,6 ± 0,1
35-164§	n.d.*
38-164§	3,6 ± 0,3
43-164	0
48-164	0
1-160	0
1-154	0
1-145	0
38-160	0
38-154	1,0 ± 0,4
38-145	0

Reaktionsbedingungen: 5 μM RNA wurden mit 50 μM 1 in Selektionspuffer (12,5 mM $MgCl_2$) inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden der Reaktionsmischung Aliquots entnommen und an Streptavidin-Agarose gekoppelt. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} wurden mittels der Gleichung $[P]_t = (RNA] - [RNA] \cdot \exp(-k_{obs} \cdot t)$ bestimmt, wobei $[P]_t$ = Konzentration der aminoacylierten RNA zum Zeitpunkt t; [RNA] = Konzentration von Clon 11-RNA.

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

* Die Reaktion verlief zu langsam, um k_{obs} zu berechnen.

§ Die Werte für k_{obs} dieser Konstrukte wurden dreifach bestimmt. Die Aktivitäten der anderen Clone wurden in Doppelbestimmungen gemessen. Die Länge der Clone wurde durch Analyse mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestätigt.

Tabelle II

Geschwindigkeitskonstanten der intermolekularen Aminoacylierung unter Verwendung verschiedener 28-mer Oligonucleotid-Substrate.

RNA	2'-Modifikation	$Base_{147}$	k_{obs} [min^{-1}]
28	OH	C	$0,018 \pm 5 \cdot 10^{-4}$
28-dC	H	C	0
28-OCH_3	OCH_3	C	0
28-NH_2	NH_2	C	0
28-U	OH	U	$0,023 \pm 1,6 \cdot 10^{-3}$

Reaktionsbedingungen: 5 µM Ribozym 28-136 wurden mit 10 nM modifiziertem 28-mer Oligonucleotid-Substrat und 1 mM 1 in Selektionspuffer (12,5 mM $MgCl_2$) inkubiert.

Ribozym-Kinetiken

Alle Aminoacylierungsreaktionen wurden bei Raumtemperatur in Selektionspuffer bei einer $MgCl_2$-Konzentration von 12,5 mM durchgeführt. Ribonucleinsäuren wurden nach Standardprotokollen (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2nd ed. CSHL-Press, Cold Spring Harbor) am 5'-Ende [^{32}P]-markiert. Intramolekulare Reaktionen wurden in 100 µl Volumina mit den in Figur 8 und Tabelle I angegebenen Konzentrationen von Ribozym und 1 durchgeführt. Den Reaktionsansätzen wurden zu 8 verschiedenen Zeiten 10 bis 15 µl-Aliquots entnommen. Nach Ethanolfällung wurden die aminoacylierten RNAs gemäß Herstellerprotokoll (Pierce) an Streptavidin-Agarose gekoppelt, indem man die resuspendierten Proben 30 Minuten mit 50 µl gequollener

Affinitätsmatrix inkubierte. Die Streptavidin-Agarose wurde anschließend in ein Spinfilter-Reaktionsgefäß (Millipore) überführt und gründlich mit den denaturierenden Puffern W2 und W3 gewaschen. Zu diesem Zweck zentrifugierte man das Reaktionsgefäß für 1 Minute bei 12 000 g. Der Anteil an aminoacylierter RNA wurde durch Messung der Radioaktivität bestimmt. Dazu wurden sowohl der Durchfluß (Waschfraktionen) als auch die Streptavidin-Agarose im Scintillationszähler (Beckman) quantifiziert. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktionen wurden aus den erhaltenen Meßdaten durch "Curve fitting" berechnet (vgl. Fig. 8). Intermolekulare Reaktionen wurden in 25 µl-Volumina durchgeführt. Konzentrationen der Hinreaktion: [Ribozym 28-136] = 5,0 µM, [28-mer] = 20 nM und [1] = 0,2, 0,5, 1,0, 2,5, und 5,0 mM. Konzentrationen der Rückreaktion: [Ribozym 28-136] = 5,0 µM, [28-mer-Phe-Biotin] = 5 nM, und [AMP] = 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, und 10,0 mM. Zu 10 verschiedenen Zeiten wurden 2 µl-Aliquots entnommen, wobei die Reaktion durch Zugabe von 5 µl PAGE Puffer (9,0 M Harnstoff, 20 mM EDTA) und Kühlung auf -80°C gestoppt wurde. Die so erhaltenen Proben wurden anschließend auf einem 20%igen Polyacrylamidgel analysiert und am Phosphorimager (Molecular Dynamics) ausgewertet (vgl. Fig. 9a und 10). Die Werte für k_{obs} wurden mit Hilfe dieser Daten durch "Curve fitting" bestimmt (vgl. Fig. 9b). Die Gleichgewichtskonstante K der intermolekularen Reaktion wurde berechnet nach:

$$K = \frac{[28merPheBio] \times [AMP]}{[28mer] \times [BioPheAMP]}$$

Inhibitionsstudien wurden mit 0,045, 0,45, 2,25, 4,5 und 11,25 mM AMP bzw. Biotin, 11 µM Ribozym 28-164 und 45 µM Substrat 1 durchgeführt. Zu fünf verschiedenen Zeiten wurden dem Reaktionsansatz Aliquots entnommen und wie für die intramolekulare Kinetik beschrieben analysiert. Die Werte der

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Inhibitionskonstanten K_i berechnete man nach $k_{obs} = k_0/(1+[I]/K_i)$, mit k_{obs} = beobachtete Geschwindigkeitskonstante, k_0 = Geschwindigkeit der nicht-inhibierten Reaktion, [I] = Inhibitorkonzentration, und K_i = Konzentration bei halbmaximaler Inhibition.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Selektion eines Ribozyms, das 2'-OH-Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren kann, wobei das Verfahren durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:
 (a) Inkubation einer Ribonucleinsäurebibliothek mit einem Reaktanden, der mit einer 2'-OH-Gruppe in Ribonculeinsäuren reagieren kann,
 (b) Selektion und Isolation von Ribonucleinsäuren, die mit dem Reaktanden eine kovalente Bindung eingegangen sind,
 (c) Umschreibung in cDNA und Amplifikation der in Schritt (b) erhaltenen Ribonucleinsäuren,
 (d) Iteratives Durchlaufen der Schritte (a) bis (c),
 (e) Sequenzbestimmung der selektierten Ribonucleinsäuren,
 (f) Bestimmung der modifizierten 2'-OH-Gruppe innerhalb der selektierten Ribonucleinsäuren,
 (g) Spaltung der selektierten Ribonucleinsäure in einen Substratteil (I) und katalytischen Teil (II = Ribozym),
 (h) Überprüfung, ob der katalytisch aktive Teil (II) den Substratteil in trans kovalent modidfizieren kann.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die 2'-OH-Gruppe des Substratteils acyliert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei der Donor für den auf die 2'-OH-Gruppe des Substratteils zu übertragenden Aminosäureteil Biotinyl-N-Phenylalanyl-2'(3')-Adenosin-5'-monophosphat (Bio-Phe-AMP) ist.

4. Ribozym, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3.

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

5. Ribozym nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet daß es
(a) die in Figur 6a durchgestellte Sekundärstruktur und Nucleinsäuresequenz von Position 28 bis 136 aufweist, oder
(b) eine von (a) abweichende Sequenz und/oder Sekundärstruktur aufweist, wobei diese Abweichungen nicht zum Verlust der ursprünglichen katalytischen Aktivtität führen.

6. DNA-Sequenz, das Ribozym nach Anspruch 4 oder 5 codierend.

7. Vektor, eine für ein Ribozym nach einem der Ansprüche 1 bis 5 codierende DNA-Sequenz enthaltend.

8. Vektor nach Anspruch 7, wobei die DNA-Sequenz mit regulatorischen Elementen funktionell verknüpft ist, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Wirtszellen erlauben.

9. Vektor nach Anspruch 7 oder 8, der ein RNA-Virus ist.

10. Vektor nach Anspruch 9, der ein Retrovirus ist.

11. Wirtszelle, einen Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis 10 enthaltend.

12. Wirtszelle nach Anspruch 11, die ein Bakterium, eine Hefe-, Insekten-, Pflanzen- oder Tierzelle ist.

13. Wirtszelle nach Anspruch 12, die eine Säugerzelle ist.

14. Verfahren zur Herstellung des Ribozyms nach Anspruch 4 oder 5, das ein enzymatisches oder chemisches Verfahren ist.

INSDOCID: <WO 9936517A2 I >

15. Arzneimittel, enthaltend des Ribozym nach Anspruch 4 oder 5, die DNA nach Anspruch 6 oder den Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis 10.

16. Arzneimittel nach Anspruch 15 zur Hemmung der Genexpression oder zur Bekämpfung von Retroviren in vitro oder in vivo.

17. Ribozym nach Anspruch 4 oder 5, DNA nach Anspruch 6 oder Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis 10 zur Verwendung als sequenzspezifische Gensonde.

18. Ribozym nach Anspruch 4 oder 5, DNA nach Anspruch 6 oder Vektor nach einem der Ansprüche 7 bis 10 zur Herstellung nucleaseresistenter Ribonucleinsäuren oder zur Herstellung transgener Pflanzen.

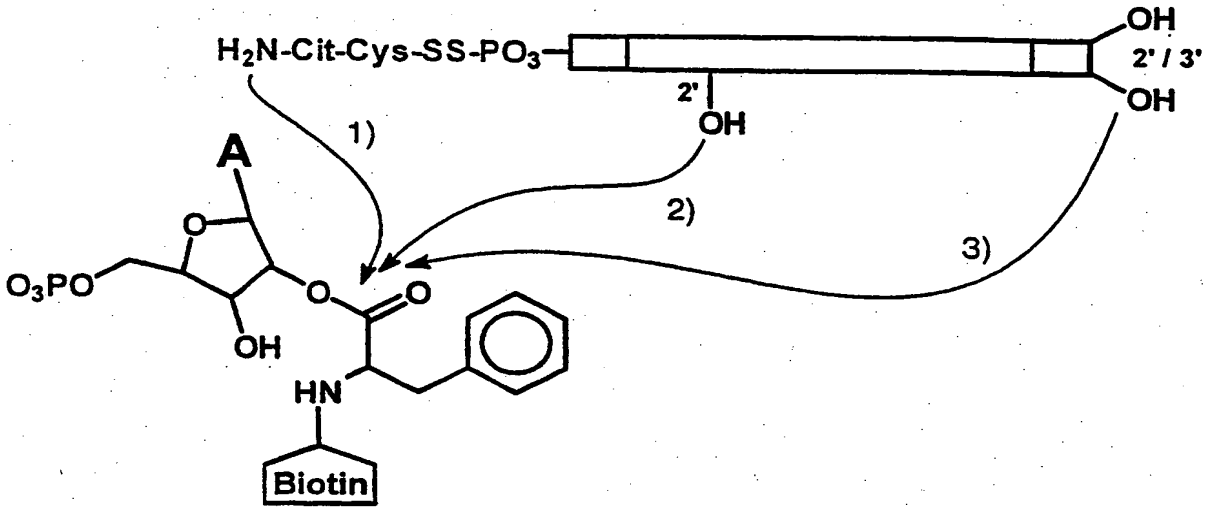
19. Verwendung des Ribozyms nach Anspruch 4 oder 5, der DNA nach Anspruch 6 oder des Vektors nach einem der Ansprüche 7 bis 10 zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Genexpression oder zur Bekämpfung von Retroviren in vivo oder in vitro, zur Herstellung nucleaseresistenter Ribonucleinsäuren oder transgener Pflanzen oder als sequenzspezifische Gensonde.

20. Ribozym, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei nur die Schritte (a) bis (f) durchgeführt werden.

21. Ribozym nach Anspruch 20 zur Verwendung als Ribozym, das tRNA-3'-Enden acyliert.

22. Ribozym nach Anspruch 20 zur Verwendung als Aminoacyl-tRNA-Synthetase.

Fig. 1



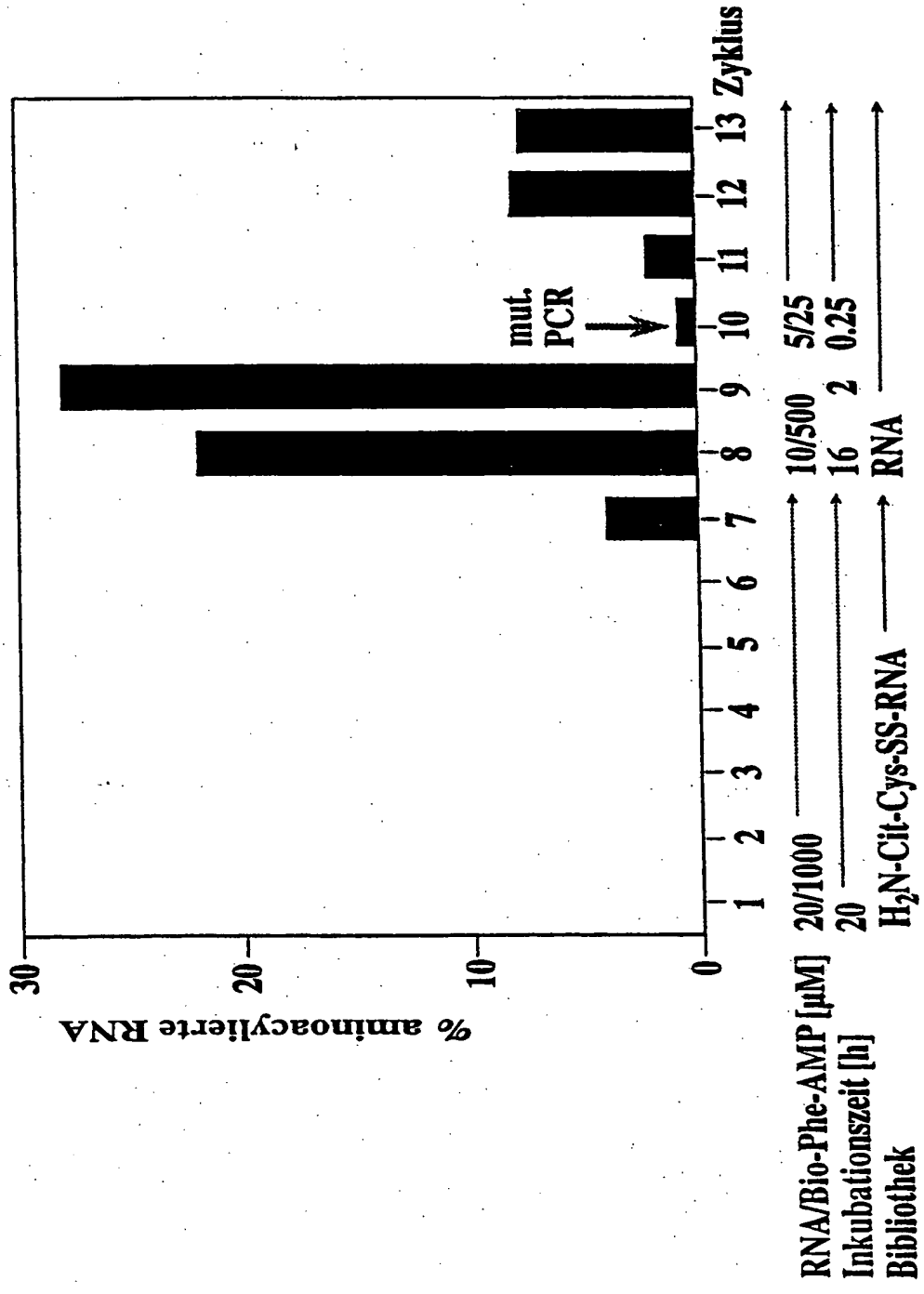


Fig. 2

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

ERSATZBLATT (REGEL 26)

Fig. 3

Klasse I

Klon	Sequenz	kobs (h^{-1})
3	CGCGCTTAGTGGCGAACGTCCGATATCGTTTTATTGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGTATCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTTC	
6	CGCGCTTTGTGGCGAACGTCCTATATATTTTTATTGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGCATCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTGG	
9	CGCGCTTTGTGGCGAACGTCCAATATCGTTTTATTGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGTGTCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTTC	
10	CGCGCTTCGTGGCGAACGTCCAATATCGTTTTATTGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGAAGAGCATCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTTC	
17	CGCGCTTTGTGGCGAACGTCC ATATCGTTTTATTGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGTGTCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTTC	2.2 ± 0.3
18	CGCGCTTCGTGGCGAACGTCC ATATCGTTTTATTGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGTGTCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTGG	
23	CGCGCTTTGTGGCGAACGTCCAATATCGTTTTATTGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGTGTCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTTC	
25	CGCGCTCTGTGGCGAACGTCCAATATCGTTTTATTGCGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGTGTCCAATGTGAGTCAATGAGTGTTGTTGTCTCCCATGTCATCGCGGGAATCTTC	
28	CGCGCTTTGTGGCGAACGTCC ATATCGTTTTATTGTGAGCTCGCAGGATCATAAACCGGATGAGTGTACAATGGGTGTCAATGAGTGTTGTTGTTTACCATGTCATCGCGGGAATCTTC	
29	CGACCTTTGTGGCGAACGTCCAATATCGTTTTATTGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGTGTCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTTC	1.9 ± 0.3
36	CGCGCTTTGTGGCGAACGTCCTATATCTTTTTATAGTGAGCTCGCAGGGTCATAAACCGGATGAGTGTCCAATGGGAGTCAATGAGTGTTGTTGTTTCCCATGTCATCGCGGGAATCTTC	

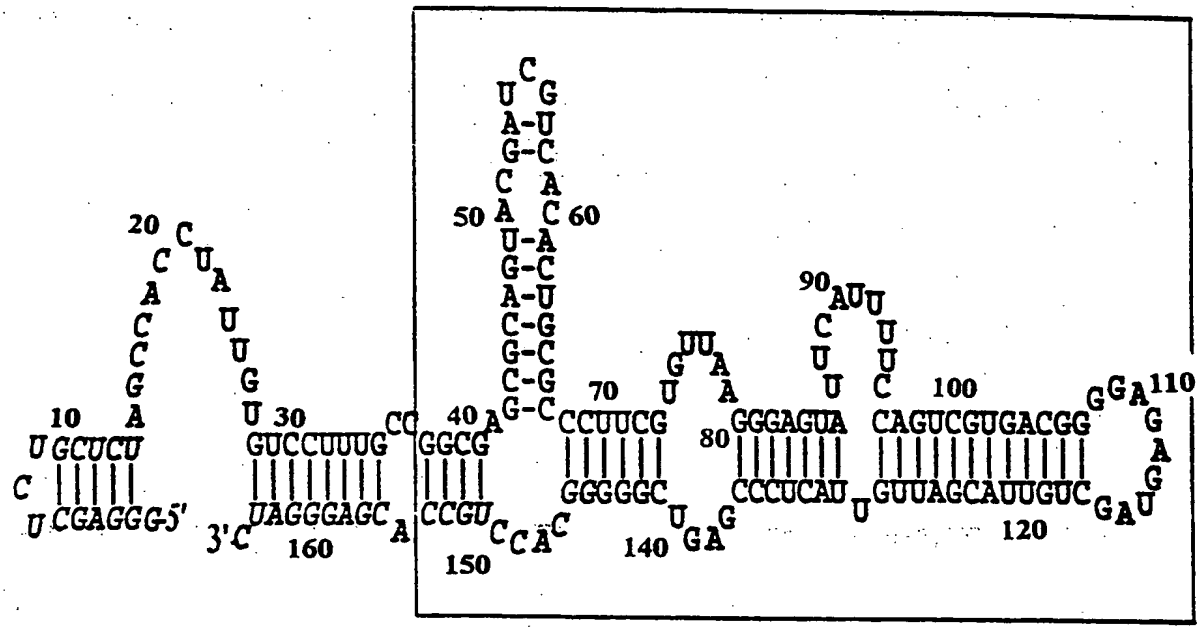
Klasse II

Klon	Sequenz	
4	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGTGTTCGTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGTGTTACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	
7	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGTGTTCATCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGGTTACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	
15	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGTGTTCGTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGTGTTACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	
16	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGTGTTCATCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGGTCACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	
19	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGCGTTCGACTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGGTTACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	
26	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTTATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGTGTTCGTCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGGTTACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	2.1 ± 0.3
27	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGTGTTCATCTTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGGTTACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCAGAG	
30	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGTGTTCGTCCTAGCGCGCATTTTGAGAGAGGGTTACTCATTATGGTAGCGAGCGCGTGTATCAGAG	2.9 ± 0.2
33	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCATGTCGCACGACGGGCACGTGTTCGTCTTAGCACGCATTTTGAGAGAGGGTTACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCTGAG	
35	GGGGCGACGTTCTATGGAGCGCCTCATGATGTCCGTCAAGTTGCACGACGGGCACGTGTTCGACTTAGCACGCATTTTGAGAGAGGGTTACTCATTATGGTTGCGAGCGCGTGTATCTGAG	

Klasse III

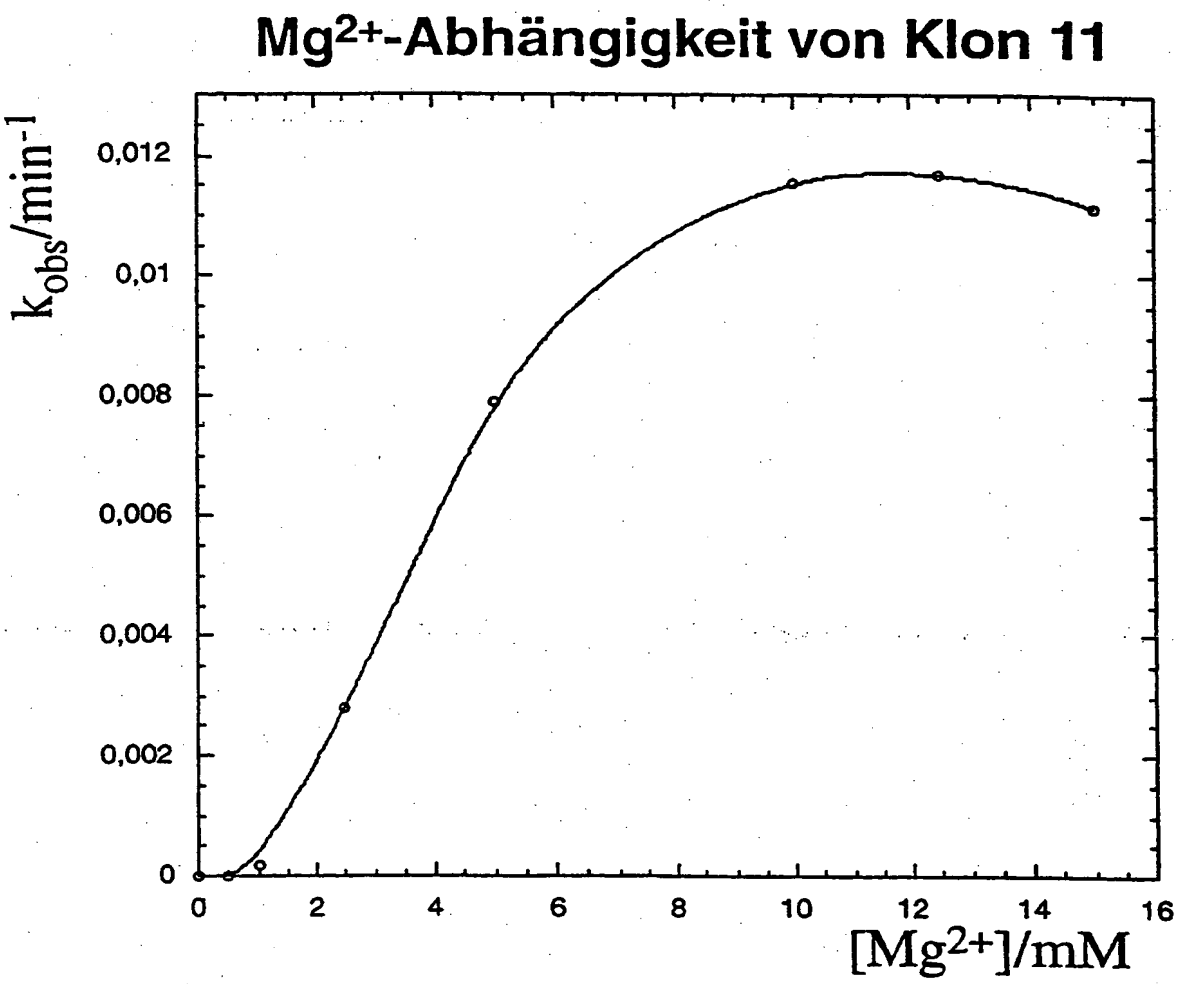
Klon	Sequenz	
5	CTATTGTGTCCTTTGCCGGCGAGCGCAGTATGATCGTCACTCTGCGCCCTTCGTGTTAAGGGAGTATTCATTTTCCAGTCGTGACGGGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG	
11	CTATTGTGTCCTTTGCCGGCGAGCGCAGTACGATCGTCACACTGCGCCCTTCGTGTTAAGGGAGTATTCATTTTCCAGTCGTGACGGGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG	1.8 ± 0.4
24	CTATTGTGTCCTTTGCTGGCGAGCGCAGTACGATCGTCACACTGCGCCCTTCGTGTTAAGGGAGTATTCATTTTCCAGTCGTGACGGGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG	
31	CTATTGTGTCCTTTGCCGGCGAGCGCAGTACGATCGTCACACTGCGCCCTTCGTGTTAAGGGAGTATTCTTTTTCCAGTCGTGACGGGGAGAGTAGCTGTTGCGATTGTTACTCCCGAGTCGGG	2.3 ± 0.2
32	CTATTGTGTCCTTTGCTGGCGAGCGCAGTACGATCGTCACACTGCGCCCTTCGTGTTAAGGGAGTATTCATTTTCCAGTCGTGACGGGGAGAGTAGCTGTTACGATTGTTACTCCCGAGTCGGG	

Fig. 4



BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Fig. 5


Mg2+-Abhängigkeit von Klon 11
kobs/min-1
0,012
0,01
0,008
0,006
0,004
0,002
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
[Mg2+]/mM

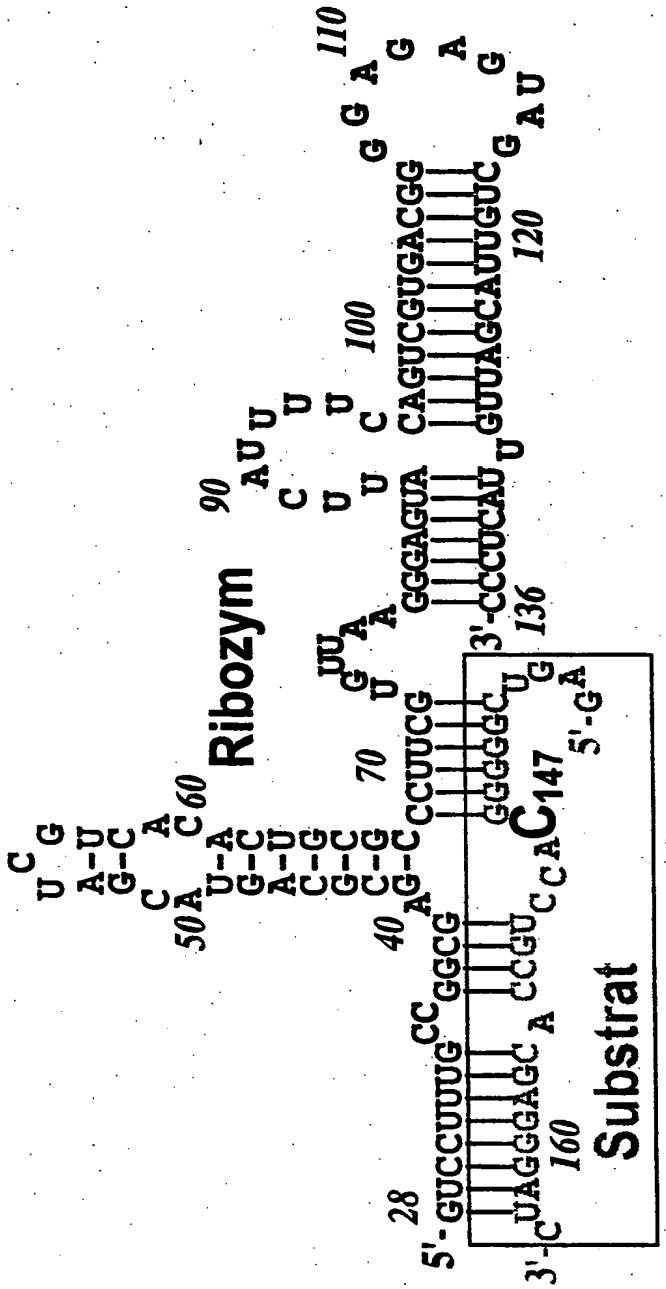
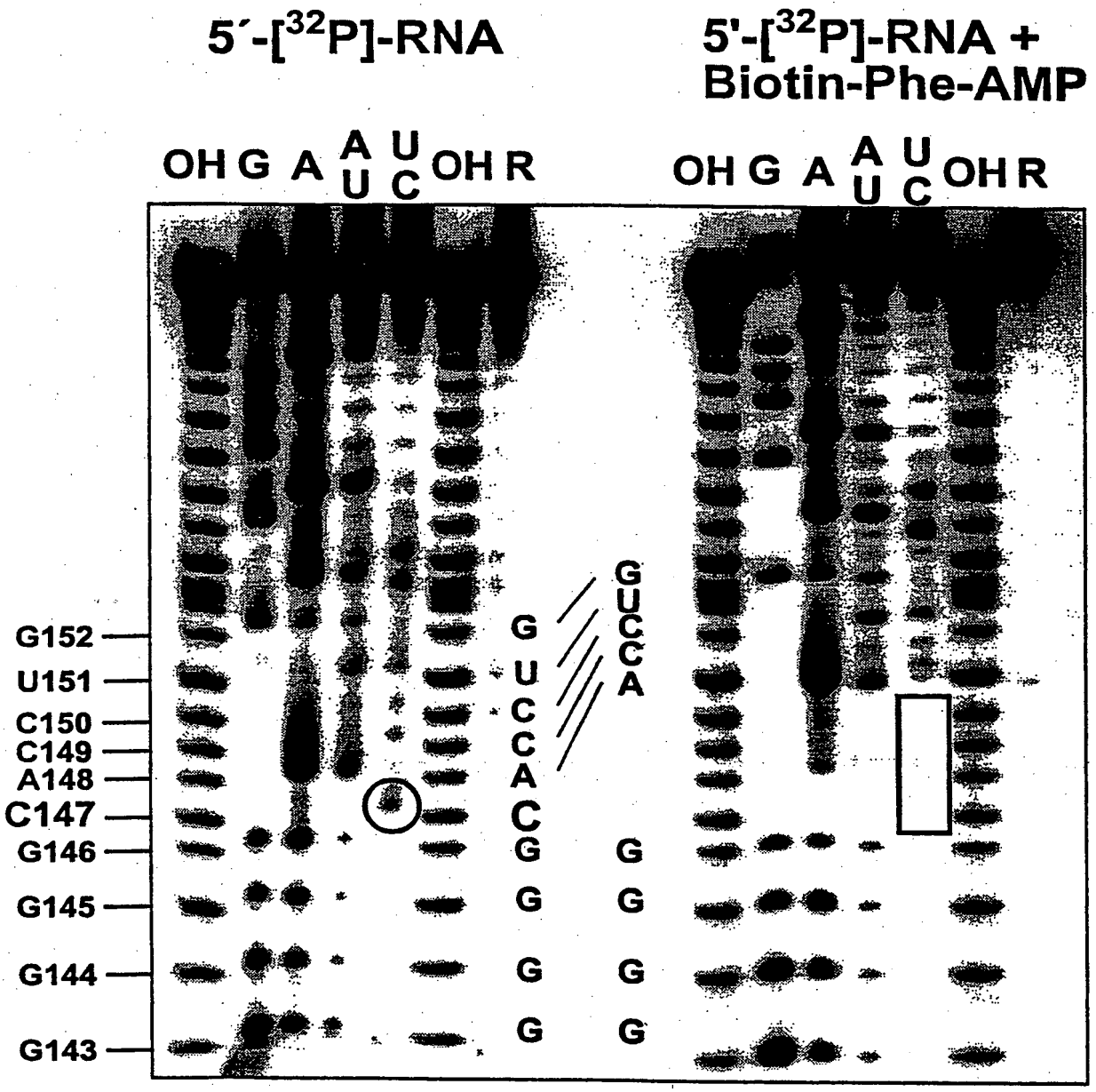


Fig. 6(a)

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Fig. 6(b)


5´-[32P]-RNA
5'-[32P]-RNA + Biotin-Phe-AMP
OH G A A U U C OH R
OH G A A U U C OH R
G152
U151
C150
C149
A148
C147
G146
G145
G144
G143
G U C C A C G G G G
G U C C A
G G G G

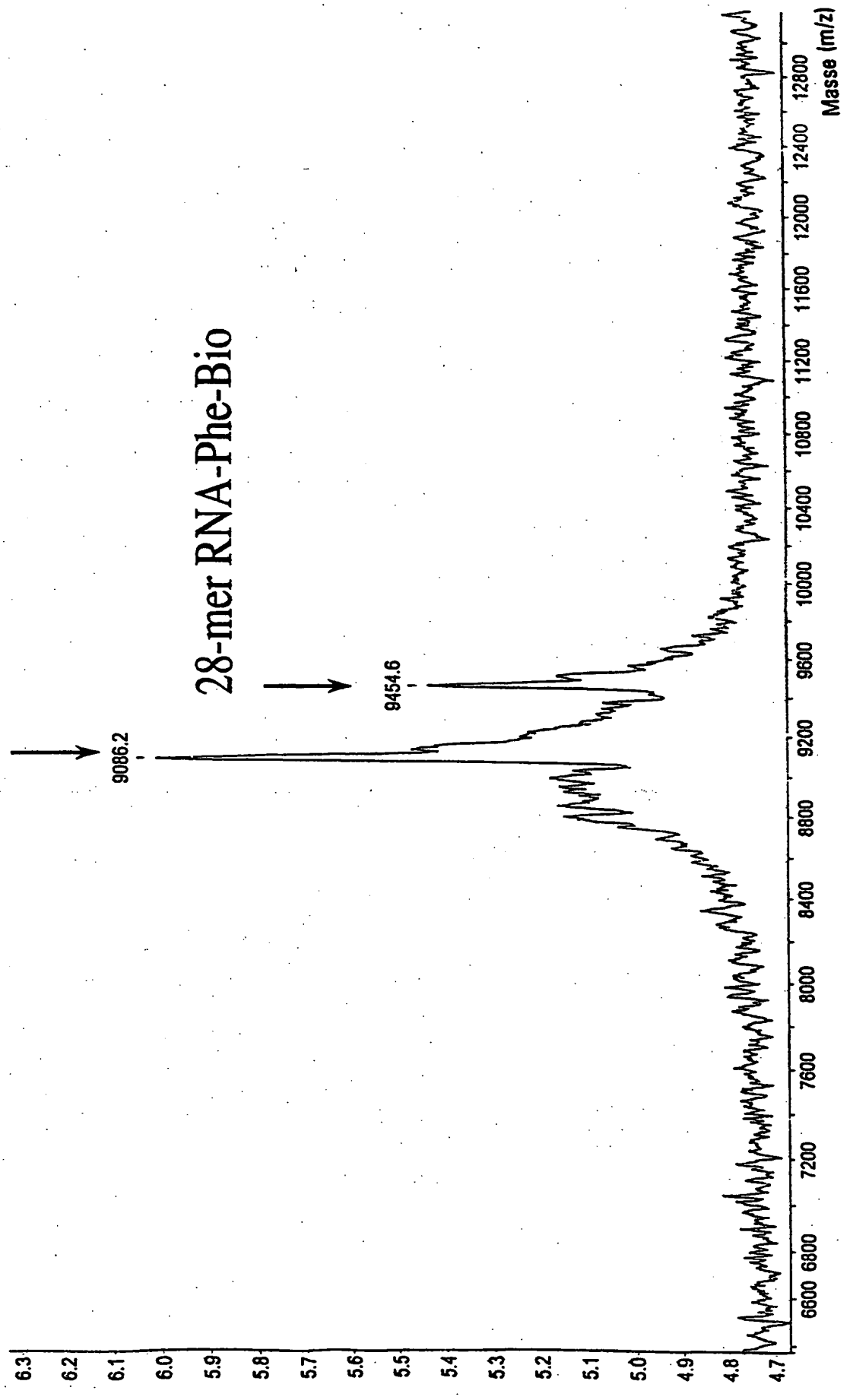


Fig. 7

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

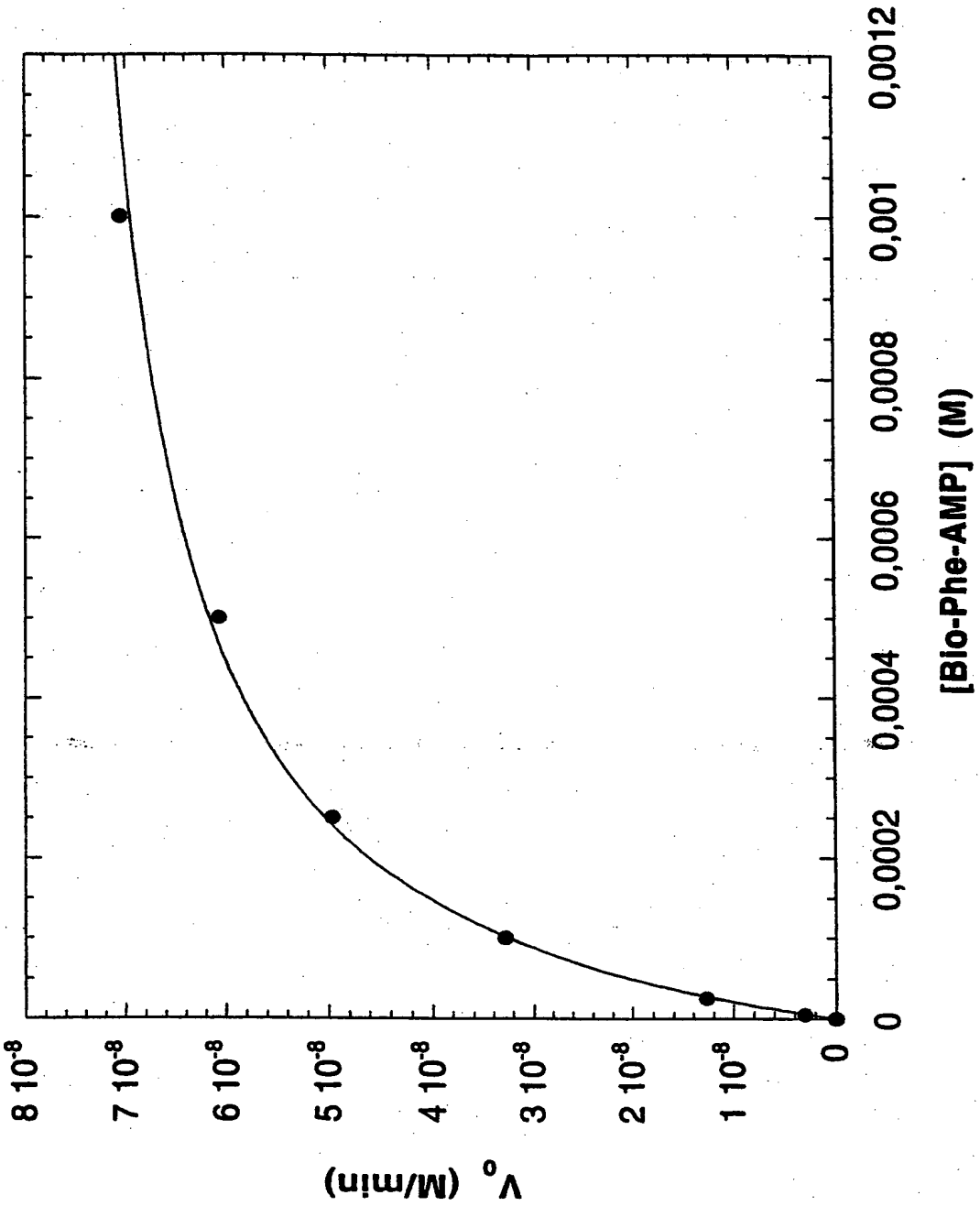

V0 (M/min)
8 10-8
7 10-8
6 10-8
5 10-8
4 10-8
3 10-8
2 10-8
1 10-8
0
0
0,0002
0,0004
0,0006
0,0008
0,001
0,0012
[Bio-Phe-AMP] (M)

Fig. 8

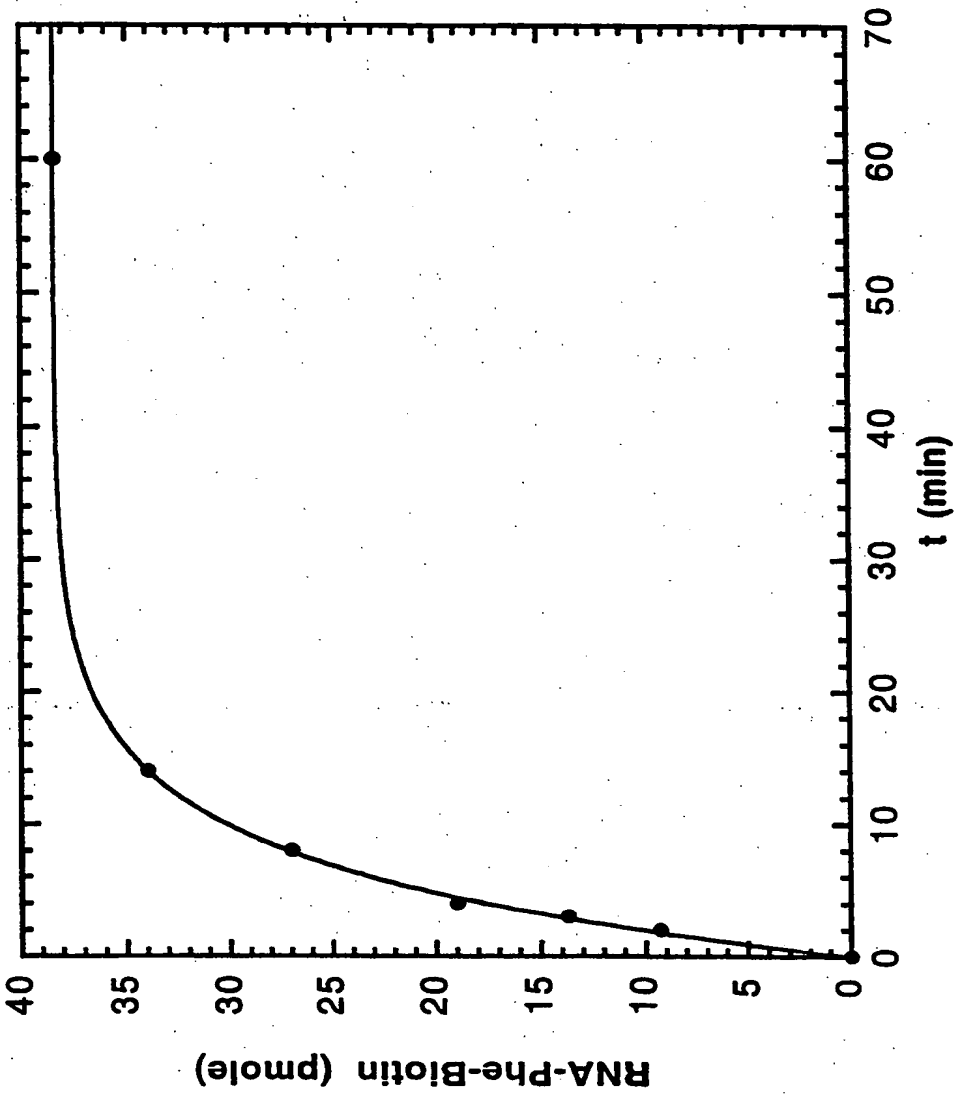
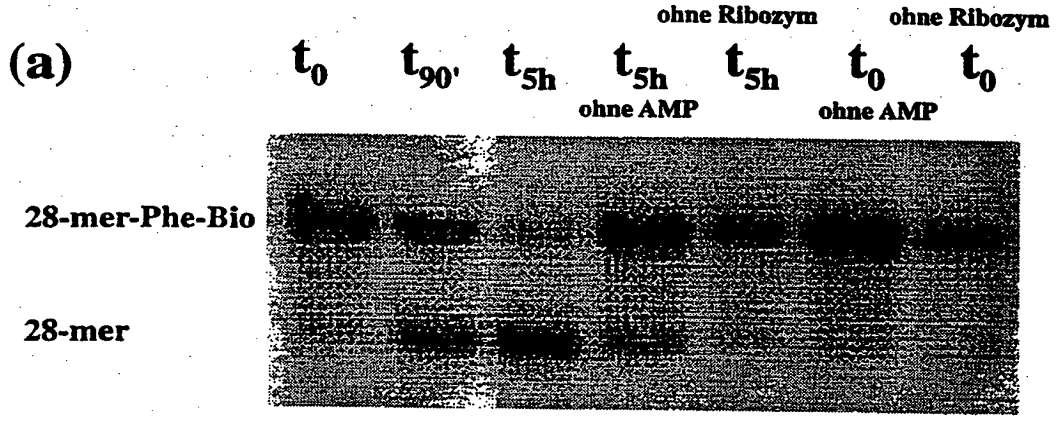


Fig. 8 (inset)

BNSDOCID: <WO 9936517A2 I >

Fig. 9


(a)
ohne Ribozym
ohne Ribozym
t_0 $t_{90'}$ t_{5h} t_{5h} t_{5h} t_0 t_0
ohne AMP
ohne AMP
28-mer-Phe-Bio
28-mer

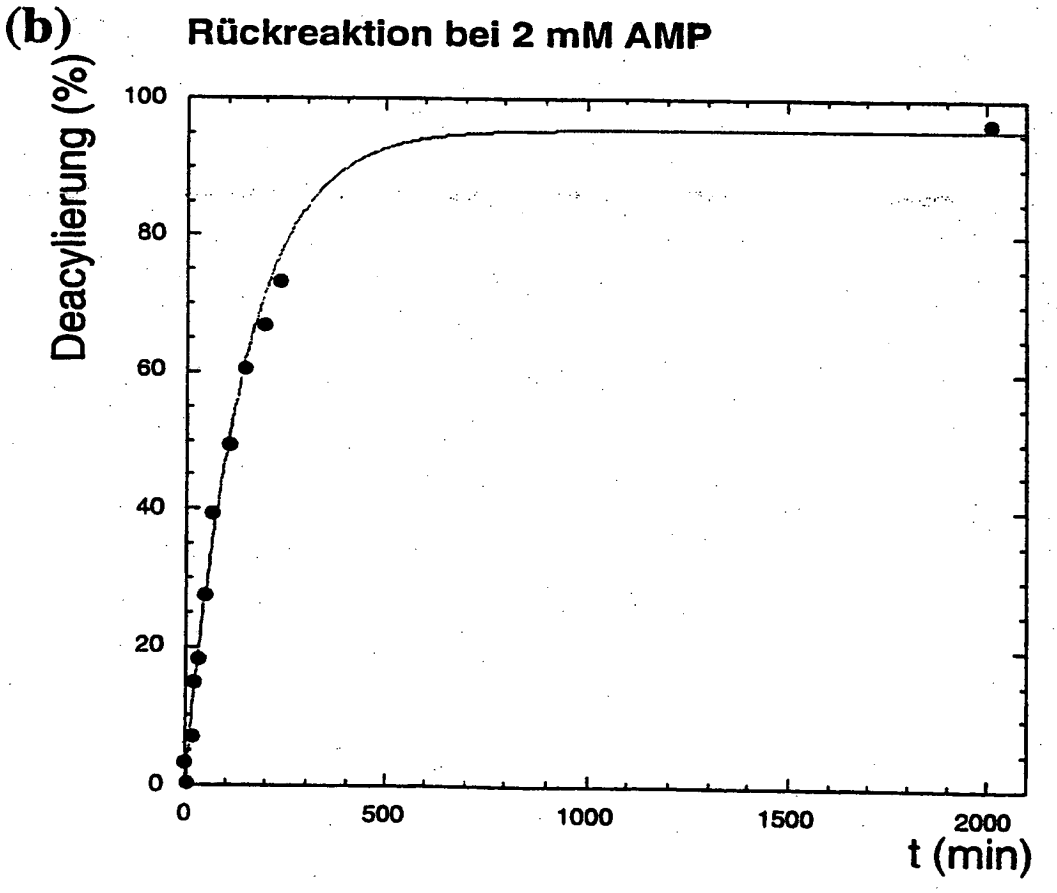

(b)
Rückreaktion bei 2 mM AMP
Deacylierung (%)
100
80
60
40
20
0
0
500
1000
1500
2000
t (min)

Fig. 10

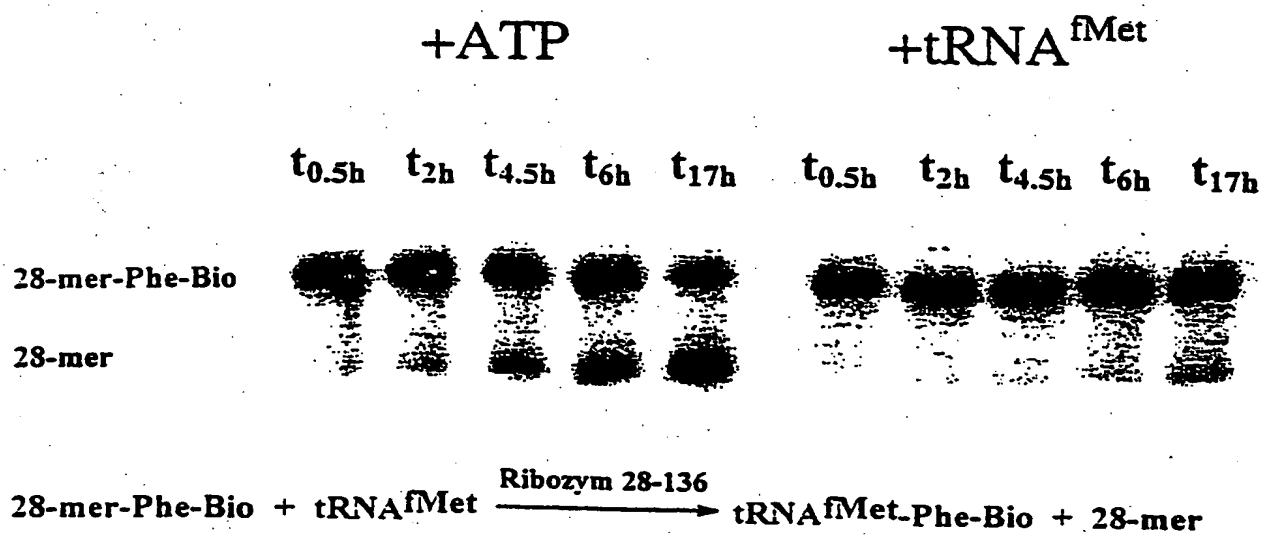
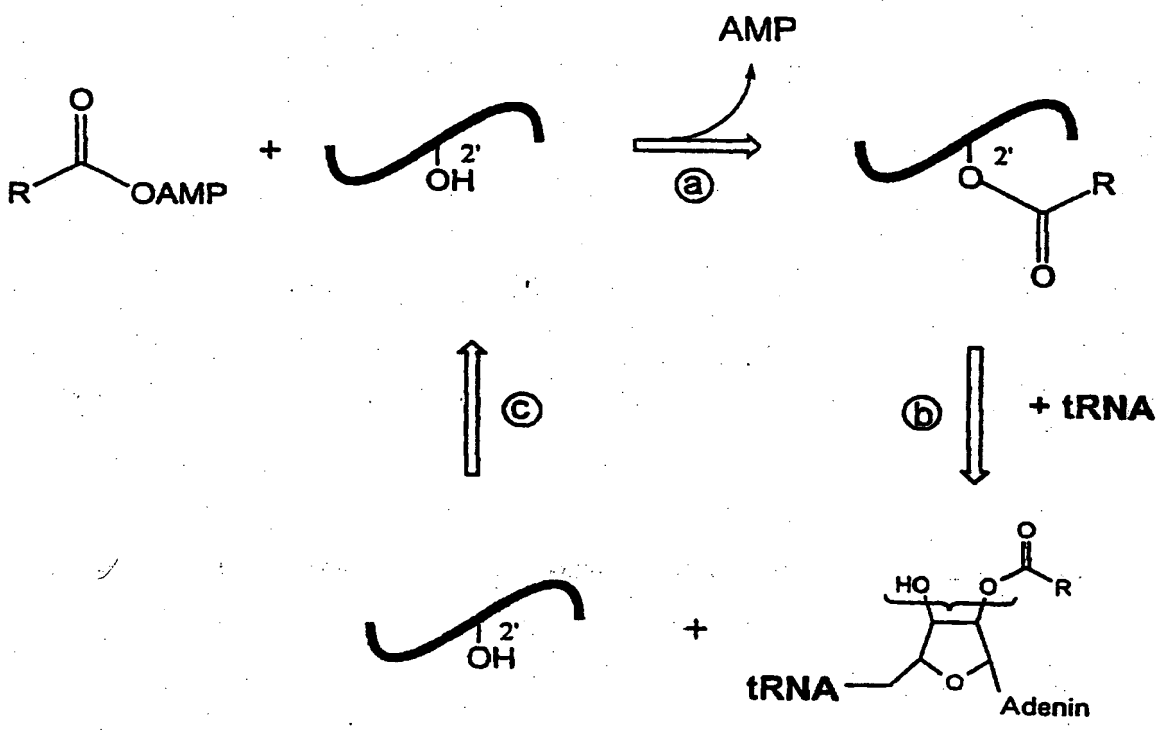

+ATP
+tRNA fMet
t0.5h t2h t4.5h t6h t17h
t0.5h t2h t4.5h t6h t17h
28-mer-Phe-Bio
28-mer
28-mer-Phe-Bio + tRNAfMet
Ribozym 28-136
tRNAfMet-Phe-Bio + 28-mer

Fig. 11



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 :		(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/36517
C12N 15/11, C12Q 1/68, C12N 9/00, 15/86, A61K 31/70 // C12N 15/52	A3	(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 22. Juli 1999 (22.07.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/00181

(22) Internationales Anmeldedatum: 14. Januar 1999 (14.01.99)

(30) Prioritätsdaten:
198 01 153.9 14. Januar 1998 (14.01.98) DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: JENNE, Andreas [DE/DE]; Angerweg 12, D–83253 Rimsting (DE).

(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D–81675 München (DE).

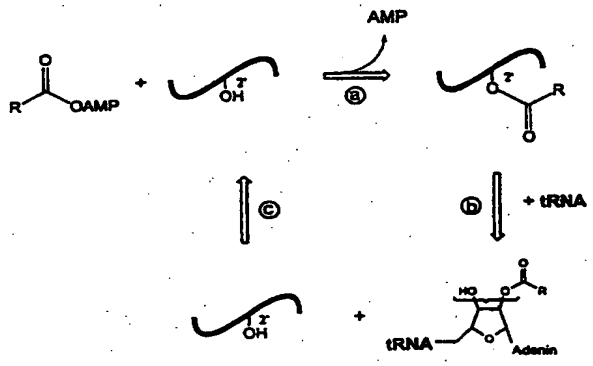
(81) Bestimmungsstaaten: IL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 23. September 1999 (23.09.99)

(54) Title: METHOD FOR SELECTING RIBOZYMES WHICH ARE CAPABLE OF COVALENTLY MODIFYING THE RIBONUCLEIC ACIDS ON 2'–OH–GROUPS IN TRANS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR SELEKTION VON RIBOZYMEN, DIE RIBONUCLEINSÄUREN IN TRANS AN 2'–OH–GRUPPEN KOVALENT MODIFIZIEREN KÖNNEN



(57) Abstract

The invention relates to an in vitro selection method for selecting ribozymes which are capable of covalently modifying the ribonucleic acids on 2'–OH–groups in trans and to the ribozymes obtained using this method. The invention also relates to medicaments containing said ribozymes, said medicaments being preferably used for inhibiting gene expression – for example in gene therapy. The inventive ribozymes can also be used for producing muteins and nuclease–resistant ribonucleic acids, for example ribonuclease–resistant "antisense" oligonucleotides.

BNSDOCID: <WO 9936517A3 I >

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vitro–Selektionsverfahren, mit dem Ribozyme selektiert werden können, die 2'–OH–Gruppen von Ribonucleinsäuren in trans kovalent modifizieren können. Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Ribozyme, die durch dieses Verfahren erhältlich sind. Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung diese enthaltende Arzneimittel, die vorzugsweise zur Hemmung der Genexpression – beispielsweise in der Gentherapie – verwendet werden können. Die erfingungsgemäßen Ribozyme können darüber hinaus zur Herstellung von Muteinen und nucleaseresistenten Ribonucleinsäuren – beispielsweise ribonucleaseresistenten "Antisense"–Oligonucleotide – verwendet werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/00181

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/11 C12Q1/68 C12N9/00 C12N15/86 A61K31/70
//C12N15/52

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ILLANGASEKARE M ET AL: "AMINOACYL-RNA SYNTHESIS CATALYZED BY AN RNA" SCIENCE, vol. 267, 3 February 1995 (1995-02-03), pages 643-647, XP002044710 ISSN: 0036-8075 the whole document ---	1-22
A	LORSCH J R ET AL: "IN VITRO EVOLUTION OF NEW RIBOZYMES WITH POLYNUCLEOTIDE KINASE ACTIVITY" NATURE, vol. 371, 1 September 1994 (1994-09-01), pages 31-36, XP002044711 ISSN: 0028-0836 cited in the application the whole document ---	1-22

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 July 1999	03/08/1999

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Andres, S

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

BNSDOCID: <WO 9936517A3 I >

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication.where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	IBBA M : "STRATEGIES FOR IN-VITRO AND IN-VIVO TRANSLATION WITH NON-NATURAL AMINO-ACIDS" BIOTECHNOLOGY & GENETIC ENGINEERING REVIEWS, (1996) VOL. 13, PP. 197-216., XP002109693 page 204 - page 210	21,22
A	PAN, T.: "Novel and variant ribozymes obtained through in vitro selection" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, vol. 1, 1997, pages 17-25, XP002109694 page 21 - page 22	1
A	HAGER, A. ET AL.: "Ribozymes : aiming at RNA replication and protein synthesis" CHEMISTRY AND BIOLOGY., vol. 3, September 1996 (1996-09), pages 717-725, XP002104957 ISSN: 1074-5521 page 722, right-hand column, paragraph 3 - page 723, right-hand column, line 19	1
P,X	JENNE A ET AL: "A novel ribozyme with ester transferase activity" CHEMISTRY & BIOLOGY, VOL. 5, NO. 1, PP. 23-34.,15 January 1998 (1998-01-15), XP002109695 the whole document	1-14

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen
PCT/EP 99/00181

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/11 C12Q1/68 C12N9/00 C12N15/86 A61K31/70
//C12N15/52

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	ILLANGASEKARE M ET AL: "AMINOACYL-RNA SYNTHESIS CATALYZED BY AN RNA" SCIENCE, Bd. 267, 3. Februar 1995 (1995-02-03), Seiten 643-647, XP002044710 ISSN: 0036-8075 das ganze Dokument ---	1-22
A	LORSCH J R ET AL: "IN VITRO EVOLUTION OF NEW RIBOZYMES WITH POLYNUCLEOTIDE KINASE ACTIVITY" NATURE, Bd. 371, 1. September 1994 (1994-09-01), Seiten 31-36, XP002044711 ISSN: 0028-0836 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	1-22

-/--

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[] Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
20. Juli 1999	03/08/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Andres, S

1

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

3NSDOCID: <WO 9936517A3 I >

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 99/00181

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	IBBA M : "STRATEGIES FOR IN-VITRO AND IN-VIVO TRANSLATION WITH NON-NATURAL AMINO-ACIDS" BIOTECHNOLOGY & GENETIC ENGINEERING REVIEWS, (1996) VOL. 13, PP. 197-216., XP002109693 Seite 204 - Seite 210 ---	21,22
A	PAN, T.: "Novel and variant ribozymes obtained through in vitro selection" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, Bd. 1, 1997, Seiten 17-25, XP002109694 Seite 21 - Seite 22 ---	1
A	HAGER, A. ET AL.: "Ribozymes : aiming at RNA replication and protein synthesis" CHEMISTRY AND BIOLOGY., Bd. 3, September 1996 (1996-09), Seiten 717-725, XP002104957 ISSN: 1074-5521 Seite 722, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 723, rechte Spalte, Zeile 19 ---	1
P,X	JENNE A ET AL: "A novel ribozyme with ester transferase activity" CHEMISTRY & BIOLOGY, VOL. 5, NO. 1, PP. 23-34.,15. Januar 1998 (1998-01-15), XP002109695 das ganze Dokument -----	1-14

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)